

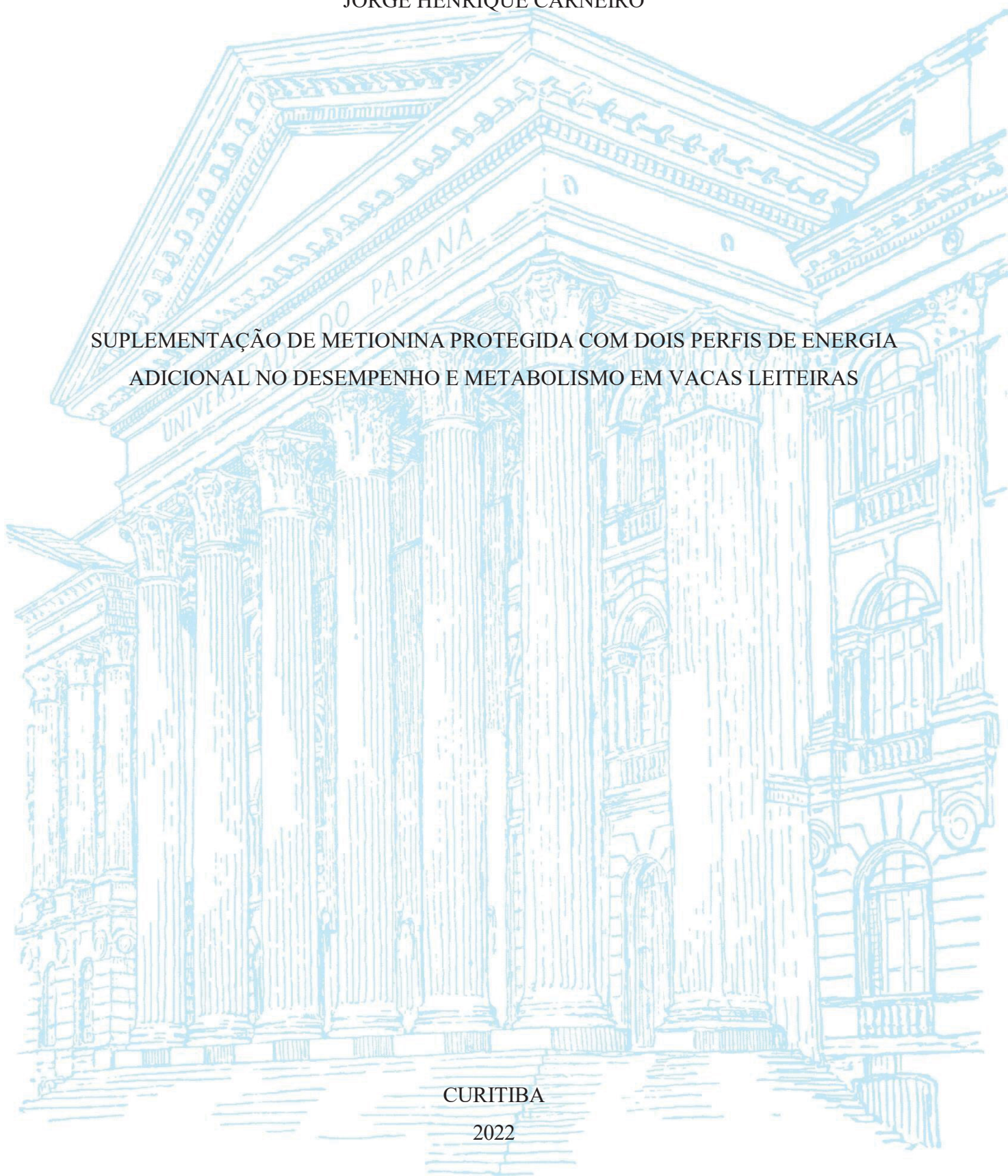
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JORGE HENRIQUE CARNEIRO

SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA COM DOIS PERFIS DE ENERGIA
ADICIONAL NO DESEMPENHO E METABOLISMO EM VACAS LEITEIRAS

CURITIBA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JORGE HENRIQUE CARNEIRO

SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA COM DOIS PERFIS DE ENERGIA
ADICIONAL NO DESEMPENHO E METABOLISMO EM VACAS LEITEIRAS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Carneiro, Jorge Henrique

Suplementação de metionina protegida com dois perfis de energia adicional no desempenho e metabolismo em vacas leiteiras / Jorge Henrique Carneiro. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

1. Aminoácidos. 2. Gordura do leite. 3. Metionina. 4. Vacas. I. Almeida, Rodrigo de. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

Bibliotecária: Telma Terezinha Stresser de Assis CRB-9/944

ATA Nº122022

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM ZOOTECNIA**

No dia trinta de agosto de dois mil e vinte e dois às 08:00 horas, na sala de reuniões do PPGZ, Setor de Ciências Agrárias da UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **JORGE HENRIQUE CARNEIRO**, intitulada: **Suplementação de metionina protegida com dois perfis de energia adicional no desempenho e metabolismo em vacas leiteiras**, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO DE ALMEIDA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: RODRIGO DE ALMEIDA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ALEXANDRE MENDONCA PEDROSO (CARGILL - BRASIL), POLYANA PIZZI ROTTA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA), MARINA DE ARRUDA CAMARGO DANÉS (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS), PATRICK SCHMIDT (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, RODRIGO DE ALMEIDA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica
30/08/2022 17:53:18.0
RODRIGO DE ALMEIDA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 14:24:25.0
ALEXANDRE MENDONCA PEDROSO
Avaliador Externo (CARGILL - BRASIL)

Assinatura Eletrônica
20/09/2022 17:31:26.0
POLYANA PIZZI ROTTA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2022 15:45:14.0
MARINA DE ARRUDA CAMARGO DANÉS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS)

Assinatura Eletrônica
30/08/2022 20:33:08.0
PATRICK SCHMIDT
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JORGE HENRIQUE CARNEIRO** intitulada: **Suplementação de metionina protegida com dois perfis de energia adicional no desempenho e metabolismo em vacas leiteiras**, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO DE ALMEIDA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica
30/08/2022 17:53:18.0
RODRIGO DE ALMEIDA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 14:24:25.0
ALEXANDRE MENDONCA PEDROSO
Avaliador Externo (CARGILL - BRASIL)

Assinatura Eletrônica
20/09/2022 17:31:26.0
POLYANA PIZZI ROTTA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2022 15:45:14.0
MARINA DE ARRUDA CAMARGO DANÉS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS)

Assinatura Eletrônica
30/08/2022 20:33:08.0
PATRICK SCHMIDT
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RESUMO

O balanceamento de dietas por aminoácidos vem sendo difundido em fazendas leiteiras ao passo que pesquisas tem sugerido a interação entre os metabolismos proteico e energético na fisiologia de vacas leiteiras. Dessa forma o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, associada ou não a uma fonte extra de energia com dois perfis diferentes, sobre o desempenho produtivo, metabólico e sobre o processo de síntese de gordura do leite em vacas de alta produção no meio da lactação. No primeiro experimento, foram utilizadas 112 vacas multíparas da raça Holandesa com média de $2,8 \pm 0,7$ lactações, $184,7 \pm 66,8$ dias em lactação, $49,1 \pm 6,7$ kg/d de leite, $4,1 \pm 0,6$ %G e $3,2 \pm 0,2$ %P. Os animais foram alocados em blocos em arranjo de tratamento fatorial em um dos 4 tratamentos: Controle, sem suplementação de gordura ou Met (CONT); Alta energia, com suplementação de gordura hydrogenada, porém sem Met (AE); Controle, sem suplementação de gordura, porém com suplementação de Met (MET); Alta energia, com suplementação de gordura hydrogenada e com suplementação de Met (META). O período experimental total foi de 38 dias, sendo os três primeiros dias utilizados para coleta de dados como covariáveis. As variáveis mensuradas foram produção e composição do leite, parâmetros sanguíneos e perfil de ácido graxos no leite. O grupo AE produziu mais leite ($1,5$ kg/d; $P=0,02$) e leite corrigido para energia ($2,0$ kg/d; $P<0,01$). A suplementação de MET aumentou a produção leite corrigida para energia ($0,75$ kg/d; $P=0,01$) e a excreção de energia diária no leite ($1,46$ Mcal/d; $P<0,01$). A concentração de proteína do leite foi incrementada pela suplementação de MET ($3,30$ vs. $3,11$ %; $P<0,01$) em relação aos animais do grupo CONT, porém a produção diária de proteína teve resposta para ambos os tratamentos, sendo que as suplementações de MET e AE aumentaram ($P<0,01$) 80 e 70 g/d de proteína do leite, respectivamente. A concentração de gordura do leite apenas aumentou pela MET ($+0,26$ pontos percentuais; $P<0,01$). Com relação ao perfil de ácidos graxos no leite, o tratamento AE reduziu a proporção de C16:0 e aumentou as proporções de C18:1 c11, C18:3 n3 e C17:0. Já o tratamento MET também reduziu a proporção de C16:0, porém aumentou significativamente a proporção de diversos mono e poli-insaturados (C18:1 c9, C18:1 c11 e C18:1 c13). No segundo experimento, Utilizou-se 80 vacas multíparas da raça Holandês com $2,4 \pm 0,6$ lactações, $159,5 \pm 67,7$ dias em lactação, $36,53 \pm 4,5$ kg/d de leite, $3,3 \pm 0,7$ % G e $3,1 \pm 0,2$ % P, seguindo o mesmo delineamento e período experimental, porém com os 4 seguintes tratamentos: Controle, uma dieta com 23% de amido (%MS) sem suplementação de açúcar ou Met (CONT); Alta energia, com suplementação de 1,7%MS de açúcar cristal, porém sem Met (AE); Controle, sem suplementação de açúcar, porém com suplementação de Met (MET); e a interação de ambos os tratamentos (META). O grupo AE produziu mais leite fluido ($2,2$ kg/d; $P<0,01$) e leite corrigido para energia ($1,6$ kg/d; $P<0,01$), além de aumento na produção diária de proteína e lactose. A suplementação de MET aumentou a concentração de P% ($0,10$ pontos percentuais $P<0,01$) e tendeu a aumentar a de G% ($0,13$, $P=0,11$), porém sem nenhuma resposta em produção diária de sólidos. Interessantemente, houve redução de $0,09$ pontos percentuais no teor de lactose ($P=0,02$) nos grupos suplementados com MET. Houve um aumento significativo de $7,9$ % ($P=0,05$) na eficiência do uso do N por kg de proteína produzida na interação entre MET e AE. A amplitude de resposta a suplementação de MET parece não ser apenas aditiva, mas dependente do perfil energético da dieta, onde dietas pouco glicogênicas parecem ser menos interativas com AA.

Palavras-chave: Aminoácido; Gordura do leite; Energia; Perfil de gordura do leite.

ABSTRACT

The balance of diets by amino acids has been widespread in dairy farms, while research has suggested the interaction between protein and energy metabolism in the physiology of dairy cows. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of ruminally protected methionine supplementation, associated or not with an extra source of energy with two different profiles, on productive and metabolic performance and on the process of milk fat synthesis in cows of high production in the middle of lactation. In the first experiment, 112 multiparous Holstein cows with an average of 2.8 ± 0.7 lactations, 184.7 ± 66.8 days in lactation, 49.1 ± 6.7 kg/d of milk, $4, 1 \pm 0.6$ %F and 3.2 ± 0.2 %P. The animals were allocated in blocks in a factorial treatment arrangement in one of the 4 treatments: Control, without fat or Met supplementation (CONT); High energy, with hydrogenated fat supplementation, but without Met (HE); Control, without fat supplementation, but with Met (MET) supplementation; High energy, with hydrogenated fat supplementation and with Met supplementation (METHE). The total experimental period was 38 days, with the first three days used for data collection as covariates. The variables measured were milk production and composition, blood parameters and fatty acid profile in milk. The HE group produced more milk (1.5 kg/d; $P=0.02$) and energy-corrected milk (2.0 kg/d; $P<0.01$). MET supplementation increased energy-corrected milk production (0.75 kg/d; $P=0.01$) and daily energy excretion in milk (1.46 Mcal/d; $P<0.01$). Milk protein concentration was increased by MET supplementation (3.30 vs. 3.11%; $P<0.01$) in relation to animals in the CONT group, but the daily protein production had a response for both treatments, MET and HE supplements increased ($P<0.01$) 80 and 70 g/d of milk protein, respectively. Milk fat concentration only increased by MET (+0.26 percentage points; $P<0.01$). Regarding the fatty acid profile in milk, the HE treatment reduced the C16:0 ratio and increased the C18:1 c11, C18:3 n3 and C17:0 ratios. The MET treatment also reduced the proportion of C16:0, but significantly increased the proportion of several monounsaturated and polyunsaturated (C18:1 c9, C18:1 c11 and C18:1 c13). In the second experiment, 80 multiparous Holstein cows with 2.4 ± 0.6 lactations, 159.5 ± 67.7 days in lactation, 36.5 ± 4.5 kg/d of milk, 3.3 ± 0.7 %F and 3.1 ± 0.2 %P, following the same design and experimental period, but with the following 4 treatments: Control, a diet with 23% starch (%DM) without sugar supplementation or Met(CONT); High energy, supplemented with 1.7% DM of crystal sugar, but without Met (HE); Control, without sugar supplementation, but with Met (MET) supplementation; and the interaction of both treatments (METHE). The HE group produced more fluid milk (2.2 kg/d; $P<0.01$) and energy-corrected milk (1.6 kg/d; $P<0.01$), in addition to an increase in daily protein production and lactose. MET supplementation increased the concentration of P% (0.10 percentage points $P<0.01$) and tended to increase that of F% (0.13, $P=0.11$), but without any response in daily production of solids. Interestingly, there was a reduction of 0.09 percentage points in lactose content ($P=0.02$) in the groups supplemented with MET. There was a significant increase of 7.9% ($P=0.05$) in the efficiency of N use per kg of protein produced in the interaction between MET and HE. The amplitude of response to MET supplementation appears to be not only additive, but dependent on the energy profile of the diet, where low-glycogenic diets appear to be less interactive with AA.

Keywords: Amino acid; Milk fat; Energy; Milk fat profile.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EFEITO DO MAIOR APORTE DE METIONINA SOBRE PERCENTUAL E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E GORDURA DO LEITE.....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PONTO DE INTERRUPÇÃO ESTIMADO PARA AS CONCENTRAÇÕES REQUERIDAS DE LYS E MET NA PM PARA CONTEÚDO E PRODUÇÕES MÁXIMAS DE PROTEÍNA DO LEITE PARA OS MODELOS NRC, CPM E AMTS USANDO A BASE DE DADOS DO NRC (2001) (SCHWAB ET AL., 2009, WHITEHOUSE ET AL., 2009	20
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO (EM PERCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) DAS DIETAS COM OU SEM ADIÇÃO DE GORDURA HIDROGENADA, E COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL	48
TABELA 3 - NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS, ESTIMADAS COM BASE NO MODELO AMTS.....	48
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DOS ALIMENTOS VOLUMOSOS UTILIZADOS NAS DIETAS EXPERIMENTAIS	49
TABELA 5 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AE OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS EM DADOS DE DESEMPENHO PRODUTIVO.....	54
TABELA 6 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AE OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS SOBRE O PERFIL DA GORDURA DO LEITE	59
TABELA 7 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AE OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS EM METABÓLITOS SANGUÍNEOS	63
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO (EM PERCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) DAS DIETAS COM OU SEM ADIÇÃO DE GORDURA HIDROGENADA, E COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL	75
TABELA 9 - NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS, ESTIMADAS COM BASE NO MODELO NASEM (2021)	75
TABELA 10 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AÇÚCAR, OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS, EM DIETAS DE BAIXO AMIDO, SOBRE DADOS DE DESEMPENHO PRODUTIVO	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – aminoácido
AAE – aminoácidos essenciais
AANE – aminoácidos não essenciais
AG – ácido graxo
AGMI – ácidos graxos monoinsaturados
AGNE – ácidos graxos não esterificados
AGPI – ácidos graxos polinsaturados
AGS – ácidos graxos saturados
Arg – arginina
BEN – balanço energético negativo
BPN – balanço proteico negativo
CMS - consumo de matéria seca
°C - graus Celsius
DEL – dias em lactação
ECC – escore de condição corporal
EE - extrato etéreo
FDA - fibra em detergente ácido
FDN - fibra em detergente neutro
%G - porcentagem de gordura do leite
Gln - glutamina
His – histidina
Ile- isoleucina
Lys - lisina
Met – metionina
MM – matéria mineral
MS - matéria seca
mTORC1 - complexo 1 de rapamicina
NUL - nitrogênio ureico no leite
%P - porcentagem de proteína do leite
PB - proteína bruta
PDR – proteína degradável no rúmen
Phe - fenilalanina
PNDR – proteína não degradável no rúmen

PM – proteína Metabolizável

Pmic – proteína microbiana

SAM – S-adenosilmetionina

Trp - triptofano

Thr - treonina

TMR - total mixed ration

TorAA - TorAminoácidos

Val – valina

VLDL – lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
2 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 PDR, PNDR E PM	13
2.2 AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E O CONCEITO DE LIMITANTE.....	15
2.3 DEMANDA DE AMINOÁCIDOS PARA VACAS EM LACTAÇÃO	18
2.4 APORTE DE AMINOÁCIDOS E DESEMPENHO DE VACAS EM LACTAÇÃO	23
2.5 INTERAÇÃO ENTRE AMINOÁCIDOS E ENERGIA	30
2.6 CONCLUSÃO.....	31
2.7 REFERÊNCIAS	32
3 CAPÍTULO II: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE, ASSOCIADA OU NÃO A UMA FONTE LIPÍDICA DE ENERGIA, SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO	42
3.1 INTRODUÇÃO.....	45
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.2.1 ANIMAIS UTILIZADOS E INSTALAÇÕES.....	46
3.2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS	46
3.2.3 DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO DO LEITE E METABÓLITOS	50
3.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.3.1 PRODUÇÃO DE LEITE	52
3.3.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE	53
3.3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA GORDURA DO LEITE	57
3.3.4 METABÓLITOS SANGUÍNEOS.....	62
3.4 CONCLUSÃO.....	62
3.5 REFERÊNCIAS	64
4 CAPÍTULO III: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE EM DIETA COM BAIXO TEOR DE AMIDO, ASSOCIADA OU NÃO A UMA FONTE DE AÇÚCAR, SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS.....	70
4.1 INTRODUÇÃO.....	71
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.2.1 DIETAS EXPERIMENTAIS	74

4.2.2 DESEMPENHO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	76
4.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.4 CONCLUSÃO	80
4.5 REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS

O balanceamento de dietas para vacas em lactação tem sido modificado, principalmente no que se refere ao balanceamento de dietas objetivando aumentos nas concentrações de sólidos no leite. Isto ocorre devido aos maiores desafios de alimentar vacas de maior potencial genético, aos incrementos consideráveis dos custos com alimentação notadamente na última década e as mudanças no mercado de lácteos no país. Além do maior interesse e reconhecimento por parte dos produtores de que os teores de sólidos do leite possuem estreita relação com saúde ruminal, algumas bacias leiteiras do país passam por um processo de valorização dos teores de gordura (%G) e proteína (%P) do leite. Como exemplo, atualmente em uma importante bacia leiteira do sul do país, sistemas de pagamento encorajam os produtores a aumentos de %G e %P de seus rebanhos, com possíveis bonificações de 10% sobre o preço base, para cada ponto percentual adicional de %G e %P acima de 3,1% e 3,0%, respectivamente (POOL LEITE, 2020).

Sabidamente o teor de gordura do leite é mais responsivo a fatores dietéticos quando comparado ao teor de proteína, principalmente em magnitude de resposta, seja ela negativa ou positiva. Assim, o investimento ao se balancear uma dieta com objetivo de incrementar os teores de gordura do leite podem parecer mais atrativos economicamente quando comparados ao retorno sobre aumentos de proteína do leite, uma vez que em alguns mercados, como citado no parágrafo anterior, ambos possuem bonificações com magnitudes semelhantes. Por outro lado, tipicamente, os incrementos em proteína do leite acompanham os incrementos em volume de leite, enquanto que aumentos no teor de gordura do leite, normalmente vêm acompanhados de declínio na produção de leite.

O balanceamento de aminoácidos (AAs) para vacas em lactação tem sido assunto de interesse cada vez mais frequente, tanto devido ao avanço do conhecimento do metabolismo, como pelo crescente interesse em maior produção de proteína do leite por unidade animal, ou seja, pela otimização da eficiência de uso da proteína dietética. Há mais de 50 anos, aminoácidos como metionina (Met) e lisina (Lys) são alvos de interesse de estudo na dieta de vacas leiteiras, uma vez que ambos têm sido considerados como os principais AAs limitantes nas dietas mais usuais de vacas especializadas. Porém, como será abordado no próximo capítulo, a definição de AA limitante, ou de seu papel como simples “bloco de construção” da caseína do leite e de outras proteínas lácteas e corporais, tem sido bastante questionada. Percebe-se que alguns AAs possuem funções além de serem simples componentes de proteínas, que possuem papéis centrais na modulação da síntese e catabolismo celular, sendo reguladores

ou ativadores de diversos processos metabólicos dentro da célula, e assim nos levando a olhar para alguns AAs de modo mais abrangente, com novas oportunidades, bem como sobre suas respostas obtidas em diversos ensaios científicos.

Dentre os 10-12 AAs categorizados como limitantes, Met tem recebido bastante atenção, certamente devido ao maior grau de evidência de sua deficiência em dietas baseadas em soja e seus coprodutos como fontes proteicas majoritárias. Além de sua resposta bem estabelecida por diversos trabalhos ao se balancear Met utilizando fontes protegidas ruminalmente deste AA em aumento de proteína do leite, modulações do metabolismo de gordura também têm sido observadas, tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro*. Entender os mecanismos com que tais respostas se dão, bem como as interações dietéticas e de características dos animais para tanto, permanecem em discussão na academia.

Mais recentemente, e felizmente encorajado com a recente publicação do novo modelo do NASEM (2021), grupos de pesquisa têm sugerido e demonstrado que ambos, metabolismo proteico e energético, não funcionam de modo isolado, mas que interagem entre si. Tal hipótese muda o modo com que nutricionistas de campo comumente pensam ao balancear dietas para vacas lactantes. Atender o requerimento de proteína para produção de proteína do leite passa a não ser mais uma função apenas do fluxo intestinal de proteína sobre uma taxa fixa de eficiência de utilização, mas sim de uma interação entre o perfil e o fluxo de AAs, e do aporte e perfil energético da dieta, aumentando muito as opções de formulação para atender uma mesma resposta produtiva. Algumas lacunas ainda permanecem em discussão, como por exemplo como perfis diferentes de fontes energéticas (carboidratos estruturais, carboidratos não estruturais como amido e açúcar, lipídeos, etc.) interagem com o metabolismo aminoacídico sobre as respostas em produção não apenas de caseína, mas também de ácidos graxos do leite.

A fim de se atingirem objetivos que serão descritos a seguir, esta tese foi organizada em capítulos, tomando-se por base a normatização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Paraná, atualizada em 2017.

O Capítulo 1 corresponde à revisão de literatura, onde serão abordados temas como metabolismo proteico, novas abordagens sobre AAs na dieta de vacas em lactação, interação entre metabolismo energético e aminoacídico, e possíveis efeitos da suplementação ou do maior aporte de metionina sobre o desempenho e metabolismo.

O Capítulo 2 trata do efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, associada ou não a uma fonte lipídica extra de energia, sobre o desempenho produtivo e metabólico de vacas leiteiras de alta produção. Este capítulo teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo e parâmetros metabólicos de vacas leiteiras suplementadas com metionina protegida ruminalmente, em 2 aportes distintos de energia dietética, ajustada com

suplementação de uma fonte de gordura altamente saturada. Para identificar como o metabolismo lipídico pode interagir com o suprimento de AAs, o perfil de ácidos graxos do leite também foi investigado.

O Capítulo 3 trata do efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, associada ou não a uma fonte extra de carboidrato não amiláceo (açúcar), em dietas de baixo teor de amido, sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras em meio de lactação.

Neste contexto, o objetivo da presente tese foi avaliar possíveis efeitos da suplementação de metionina protegida ruminalmente, de modo isolado ou associado a um maior aporte de energia, em vacas leiteiras durante os períodos de pico e meio de lactação, no desempenho produtivo e no metabolismo lipídico. De modo específico, identificar possíveis relações do maior suprimento de metionina em vacas de alta produção com o metabolismo lipídico, bem como se fontes diferentes de energia (carboidratos ou lipídios) podem interagir com o maior suprimento deste aminoácido sobre o desempenho animal.

2 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

Quando falamos a respeito de formulação proteica na dieta de vacas leiteiras, um dos primeiros nutrientes a serem discutidos por nutricionistas do mundo todo é o teor de proteína bruta (PB) das dietas. Proteína bruta é definida para os alimentos como o conteúdo de nitrogênio multiplicado por um fator de 6,25. Esse fator é baseado no fato de que a maioria das proteínas contém 16% de N, com uma variação de 15 a 18% de N (LEHNINGER, NELSON e COX, 2014). O conteúdo de PB inclui proteína verdadeira (constituída por aminoácidos) e não verdadeira (nitrogênio não proteico).

Devido à população microbiana no rúmen, os ruminantes podem extrair energia de carboidratos fibrosos e transformar fontes proteicas de baixa qualidade ou nitrogênio não-proteico em proteína microbiana de alta qualidade. No entanto, a microbiota ruminal têm a primeira oportunidade de degradar a proteína verdadeira da dieta, o que dificulta a capacidade de entender e quantificar o real fluxo de aminoácidos para as vacas e os requisitos para seus fins metabólicos. A nutrição proteica do rúmen e da vaca está intrinsecamente ligada à nutrição de carboidratos que, sincronicamente, otimizam a eficiência do uso de nitrogênio (FOX et al., 2004).

Embora o balanço de PB e nitrogênio ainda tenha um papel importante em fazendas leiteiras pensando em manejo e comparação de nutrientes nos alimentos, do ponto de vista nutricional, o conceito de PB tem sido deixado de lado, uma vez que a nutrição proteica de vacas leiteiras vai muito além do uso da PB na dieta como um nutriente-alvo e agora está focada em atender as necessidades de amônia para fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e exigências de AAs da vaca (SCHWAB e BRODERICK, 2017).

2.1 PDR, PNDR E PM

O NRC (2001) e o NASEM (2021) definiram a proteína microbiana (PMic) e a proteína não degradável no rúmen (PNDR) como fontes líquidas de proteína que fluem para o intestino de vacas leiteiras. Já a fração da proteína que é degradada no rúmen, e que é utilizada para atender os requerimentos ruminais de substratos nitrogenados, é definida como proteína degradável no rúmen (PDR).

A proteína degradável no rúmen (PDR) é a fração da PB ingerida que é catabolizada pela microbiota do rúmen. Esta degradação ocorre pela ação de enzimas secretadas pelos microrganismos ruminais (proteases, peptidases e deaminases), que por sua vez, utilizam os peptídeos, AAs e amônia para multiplicação celular e síntese de proteína microbiana (PMic).

Experimentos demonstram que uma deficiência de PDR em vacas leiteiras pode levar a redução da digestibilidade da fibra e do CMS devido a menor taxa de crescimento de bactérias fibrolíticas (ALLEN, 2000; LEE et al., 2012a; GIALLONGO et al., 2015).

Além do aporte de PDR, ou seja, de substratos nitrogenados, a produção de PMic é função também do aporte de carboidratos (amido e fibra fermentáveis no rúmen, por exemplo), como foi sugerido pelo NASEM (2021) na predição do fluxo intestinal de nitrogênio microbiano e demonstrado por White et al. (2017). Comumente, a PMic corresponde a maior fonte de proteína metabolizável (PM) no intestino de ruminantes, podendo representar de 45 a 55% da PM (SANTOS, 2006). Assim, a predição de Pmic e do fluxo de PNDR do rúmen é de fundamental importância no balanceamento de dietas, pois afeta diretamente o suprimento de PM e consequentemente a composição de AAs absorvidos no trato digestivo.

O fluxo de PNDR é determinado pela combinação entre taxa de passagem (kp) e taxa de degradação (kd) da fração B da proteína (NRC, 2001), ou seja, a degradabilidade da proteína em qualquer dieta ou alimento específico depende tanto de características intrínsecas do alimento em si quanto de características do indivíduo alimentado. Quando a taxa de passagem da fase sólida da digesta pelo rúmen é mais lenta, a porção degradável de determinada proteína pode se tornar maior. O aumento apenas de PNDR em dietas de vacas leiteiras não necessariamente traz melhorias ao desempenho produtivo, principalmente se esta estratégia se der às custas de redução de PDR, levando a um menor fluxo de PMic para o duodeno (SANTOS et al., 1998; SCHWAB e BRODERICK, 2017). Acima disso, os nutrientes que essencialmente são requeridos pelos animais são os aminoácidos, oriundos tanto da digestão de PMic, quanto pelas fontes de proteína alimentar verdadeira que escapam do rúmen. A PNDR pode fornecer uma fração considerável dos AAs exigidos pela vaca, embora represente geralmente menos de 50% do fluxo de AAs totais para o intestino.

Proteína metabolizável tem sido atualmente definida como a somatória do fluxo intestinal de PMic mais a PNDR (NASEM, 2021). Previamente, proteínas de descamação e enzimas digestivas por exemplo, denominadas proteína endógena, também eram contabilizadas nas estimativas de modelos nutricionais no pool de proteínas que compunham a PM. Mais recentemente tal fonte deixou de ser incluída como fonte líquida de proteína, uma vez que por sua síntese ser quase totalmente realizada nas porções gástrica e pré-gástrica, os AAs utilizados para este processo de síntese são praticamente em sua totalidade de origem arterial, ou seja, tais AAs foram previamente absorvidos e então utilizados para tal fim, não gerando assim um aporte líquido efetivo para o animal. A partir do perfil de aminoácidos e da digestibilidade intestinal tanto da PNDR como da PMic, temos por definição o pool de AAs digestíveis, que serão

utilizados para atender os requerimentos de manutenção, produção, gestação e crescimento de um animal específico.

Para prever e reportar o balanço de PM e/ou AAs, modelos nutricionais amplamente utilizados por nutricionistas a campo, utilizam sobre o fluxo de proteína verdadeira da PM uma taxa de eficiência fixa de utilização para predição de produção de proteína do leite, conceito adotado pelo NRC (2001), no entanto, amplamente criticado pela academia atual (LAPIERRE et al., 2020; HANIGAN et al., 2018). Dados atuais sugerem que tal eficiência não apenas é variável em função do fluxo de AAs (DOEPEL et al., 2014), mas também de energia (DANIEL et al., 2016). Esta discussão será novamente abordada com mais atenção nos próximos tópicos desta revisão.

Embora as frações PB, PDR e PNDR ainda sejam consideradas por muitos nutricionistas na formulação de dietas, os artigos publicados no *Journal of Dairy Science*, iniciados há mais de 60 anos nesta área do conhecimento, fornecem evidências das limitações em confiar unicamente na proteína bruta ou metabolizável como nutrientes para os quais poderíamos basear as exigências proteicas de vacas leiteiras.

2.2 AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E O CONCEITO DE LIMITANTE

Desde que o significado nutritivo do AA foi reconhecido, sabe-se que parte dos AAs não podem ser sintetizados pelo animal ou são sintetizados a uma taxa insuficiente, para atender aos requisitos de síntese proteica. Esses aminoácidos foram denominados como AA essenciais (AAE): histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val) (SCHWAB et al., 1976). Os AAs restantes, embora necessários para a síntese proteica, podem ser sintetizados pelo animal em taxas satisfatórias a partir de outros AA, e assim são denominados de AAs não essenciais (AANE). As cadeias polipeptídicas que constituem proteínas contêm ambos, porém os AANE podem ser sintetizados pela vaca leiteira a uma velocidade suficiente para suas funções biológicas. No entanto, há um subgrupo dentro do AANE para o qual a biossíntese não é suficiente para suportar altos níveis de produção, e esses têm sido chamados de AAs semi-essenciais (LAPIERRE et al., 2007). A arginina (Arg) é um AA típico desse grupo, pois a síntese *de novo* pode representar até 40% do suprimento total do animal (DOEPEL et al., 2004). Teoricamente, a histidina também pode ser sintetizada por mamíferos, mas a via sintética tem capacidade muito limitada e, portanto, a síntese endógena é geralmente ignorada. Foi sugerido que a glutamina (Gln) também pode ser classificada como semi-essencial sob certas circunstâncias, especialmente próximo ao parto (DOEPEL et al., 2006). Pouco ainda se sabe

deste “novo” grupo de AAs, principalmente sobre as taxas de síntese *de novo*, informações essas necessárias para obter uma estimativa precisa do suprimento do animal.

Sabe-se há décadas que os animais exigem AAs para a síntese de proteínas teciduais, reguladoras e secretoras, além de dezenas de compostos como hormônios, neurotransmissores, nucleotídeos (RNA e DNA), histamina, dentre outros, e que estes precisam ser sintetizados diariamente. Porém muito que se sabe atualmente sobre as exigências destes aminoácidos, foi usando a abordagem de aminoácidos como “blocos de construção” de proteínas, que obviamente não deixa de ter sua importância.

Em vacas leiteiras, a produção de proteína do leite tem sido prevista e compreendida com base em uma abordagem fatorial empírica impulsionada pela energia fornecida para a lactação, o pool de AA digestível (referido como PM), e o conteúdo relativo do AA mais limitante neste pool comparativamente ao perfil da caseína do leite (NRC, 2001). Essa abordagem assume que o suprimento do substrato impulsiona a síntese de proteínas do leite, e quando um dos fatores é limitado (como por exemplo PM), a síntese de proteínas do leite é reduzida. Como resultado, as necessidades de AAs podem serem superestimadas, as vacas sobrealimentadas com proteína, e uma grande quantidade de N excretado no esterco (APELO et al., 2014).

Essa abordagem baseada em substrato é descrita sobre o AA mais limitante em ratos (MITCHELL e BLOCK, 1946), que levou ao desenvolvimento da teoria do AA limitante conhecida mundialmente. Com base nessa teoria, cada função biológica (por exemplo, produção de leite) requer um perfil de AA ideal, e apenas a suplementação com o AA mais limitante em relação a esse perfil ideal pode aumentar a resposta produtiva. Tal teoria ainda se baseia na lei do mínimo, que afirma um conceito semelhante, mas em relação aos minerais na nutrição das plantas, e na lei de conservação da massa de Lavoisier. Não incorretamente, a quantidade de AA essencial individual necessária para sintetizar uma determinada quantidade de proteína do leite de fato deve ser fornecida (ou então obtida através do *turnover* de proteínas do próprio corpo) como substrato para tradução, ou essas proteínas não podem ser completamente sintetizadas.

Ao assumir o conceito de AA limitante, ou seja, onde a resposta produtiva é basicamente determinada pelo substrato, algumas evidências biológicas pouco podem ser explicadas, como por exemplo a absorção de AAs pelo tecido mamário (PSZCZOLKOWSKI e ARRIOLA APELO, 2020). Esta por sua vez pode mudar drasticamente em resposta a dois fatores; ou por uma alteração do fluxo sanguíneo para o tecido, ou pela afinidade do tecido por determinado aminoácido. Bequette et al. (2000) demonstraram claramente este fato em seu estudo com cabras leiteiras, onde a restrição de His levou não apenas a um maior fluxo de

sangue para o tecido mamário, como também por um aumento de 43 vezes na afinidade mamária por aquele AA. Um sistema puramente orientado por substrato não pode explicar a resposta de produção observada; caso contrário, a produção de proteína do leite teria caído proporcionalmente à queda de 90% na His plasmática observada. Contrariamente, as células mamárias aumentaram muito sua afinidade pela His para atender à demanda pela síntese de proteínas do leite, que caiu apenas 18%.

Outro exemplo da não orientação da resposta produtiva pelo sistema biológico determinada pelo AA mais limitante como substrato foi demonstrada no estudo de Yoder et al. (2020). Neste experimento, a infusão jugular de Leu e Ile não apenas aumentou a captação mamária de vários AAs devido ao aumento do suprimento sanguíneo, mas também aumentou a afinidade mamária e a captação de His, um dos AAs limitantes. No mesmo experimento, uma infusão combinada de His, Lys e Met também aumentou a produção de proteína do leite, e surpreendentemente isso aconteceu sem aumentar a absorção líquida de dois dos AAs infundidos, His e Met. Enquanto isso, a afinidade pela Lys (o AA mais limitante nas dietas experimentais) foi mantida, aumentando a captação deste AA para suprir a produção no leite. A infusão desses três AA também reduziu a taxa de absorção de outros AAs, possivelmente para apoiar o aumento da produção de leite. Embora a última resposta possa ser explicada pela teoria limitante de AA, a resposta a Ile e Leu não pôde. Em vez disso, as respostas fisiológicas adaptativas ao tratamento resultaram em maior fluxo sanguíneo e, por sua vez, fornecimento e absorção de AA total e afinidade mamária por AAs não infundidos. De forma até fascinante, quando tanto o substrato como o AA estimulador foram fornecidos, a resposta na produção de proteína do leite foi 46% maior do que um efeito estritamente aditivo. Essas pesquisas básicas nos fornecem evidências claras de que a glândula mamária pode, de fato, mudar sua afinidade por AAs individuais.

Os aminoácidos começam a ser compreendidos não apenas como unidades estruturais das proteínas, mas também como importantes sinalizadores e ativadores de processos anabólicos e catabólicos dentro das células de diferentes tecidos. Este conceito está mais consolidado em outras espécies, particularmente aves e suínos, e em bovinos leiteiros passou a receber certa importância nos últimos 10-15 anos. Com esta abordagem, os estudos abrem espaço para outra questão interessante, que é a interação entre os diferentes metabolismos (energético, lipídico, sistema imune, etc.) com o status aminoacídico das células (HANIGAN et al., 2018). Tais observações discutidas acima sugerem que o impacto que diferentes suprimentos de AAs têm no metabolismo, bem como a eficiência com que estes serão utilizados nos processos de síntese, são dependentes da interação de outros fatores dietéticos e do próprio status hormonal do animal.

2.3 DEMANDA DE AMINOÁCIDOS PARA VACAS EM LACTAÇÃO

Na década de 70, com o objetivo de tentar identificar quais AAs seriam os mais limitantes para vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de milho, sem suplementação proteica, 5 experimentos de infusão abomasal foram conduzidos por Schwab et al. (1976). Aminoácidos isolados e misturas de diferentes AAs foram infundidos nestes animais, que apresentavam produção de leite média de 29 kg/d, um consumo de matéria seca (CMS) médio de 19 kg/d e alimentados com uma dieta de 11% PB em média. Como conclusão dos experimentos, os autores ressaltaram alguns pontos importantes: 1) a porcentagem de proteína do leite (%) foi mais sensível que o rendimento de proteína (kg) como critério de resposta às infusões de AAs; 2) Met isolada não teve efeito nas medições de produção; 3) Lys isoladamente resultou em 16% da resposta ao rendimento de proteína do leite obtida com caseinato de sódio, enquanto Lys e Met juntos responderam por 43% dessa resposta de proteína do leite; 4) ocorreram poucas alterações nas concentrações plasmáticas de outros AA quando Lys e Met foram infundidas em conjunto; e 5) a resposta na porcentagem e na produção da proteína do leite com os 10 AAE foi de mesma magnitude que a do caseinato de sódio, indicando que os AANE não eram limitantes naquela ocasião.

Numerosos experimentos desde então identificaram Met e Lys como os 2 AAs mais limitantes para vacas leiteiras em lactação alimentadas com dietas à base de milho e soja. O NRC (2001) também demonstrou a importância da Met e da Lys como os dois AAs mais frequentemente limitantes para vacas, utilizando uma abordagem de dose/resposta com a produção de proteína do leite. Segundo esta referência, as concentrações ótimas sugeridas para maximizar a utilização da PM e a produção de proteína do leite foram de 7,2% de Lys e 2,4% de Met na PM. Após a publicação do NRC (2001), recomendações de caráter mais “comerciais” foram sugeridas; 6,6-6,9% Lys e 2,2-2,3% Met, mas sempre sugerindo uma relação ótima de 3:1 entre Lys/Met. Isso é coerente com a observação de que a concentração destes dois AAs é baixa na maioria dos alimentos utilizados para vacas em lactação, se comparada à concentração deles na proteína microbiana, na proteína do leite e no tecido muscular bovino, segundo revisão publicada por Schwab e Broderick (2017).

Pesquisas realizadas após a publicação do NRC (2001) confirmaram esses achados (NOFTSGER e ST-PIERRE, 2003; SOCHA et al., 2005; ST-PIERRE e SYLVESTER, 2005; ORDWAY et al., 2009; APPUHAMY et al., 2011; CHEN et al., 2011; LEE et al., 2012b; OSORIO et al., 2013; GIALLONGO et al., 2016; ZHOU et al., 2016). Com base neste conhecimento prévio e no volume de informações disponíveis, técnicos a campo e parte da

academia científica dedicaram esforços pesquisando e encontrando meios de balancear tais AAs em dietas de vacas leiteiras. Porém, outra parte da comunidade científica passou a olhar os AAs de modo mais mecanicista e dinâmico, dando atenção para um grupo de AAs que há tempo são conhecidos na nutrição humana e de monogástricos, denominados TorAminoácidos (TorAAs), compreendidos principalmente por Leu, Ile, Met e Lys (OSORIO et al., 2016).

De fato, a maioria dos modelos clássicos norte-americanos (NRC, 2001; FOX et al., 2004) investiram tempo e esforços para desenvolver submodelos ruminais para obter uma previsão adequada do fluxo de proteínas disponível no intestino. Apesar do ajuste fino desses modelos ainda ser necessário para melhorar as previsões, trabalhos como Bateman et al. (2001) e Pacheco et al. (2006) sugerem que as estimativas estão muito próximas dos valores realmente mensurados *in vivo*. Como os fluxos de proteína ou AA para o abomaso e intestino são estimados, as previsões de produção de proteína do leite a partir deste aporte de proteína intestinal são baseadas em uma eficiência única para todos os AAs, independente da oferta do mesmo ou da concentração e interação dos demais AAs ou de outros fatores como suprimento energético e estágio de lactação por exemplo. Segundo Fox e Tedeschi (2003) tal simplificação do complexo biológico da lactação foi necessária como ponto de partida, uma vez que “o conhecimento do metabolismo dos nutrientes não é tão avançado quanto a previsão da fermentação ruminal, devido às rotas metabólicas quase infinitas que conectam vários compartimentos teciduais e metabólicos, e as múltiplas interações e as sofisticadas regulações metabólicas que determinam a partição dos nutrientes absorvidos.” Reconhece-se entretanto, que essa relação linear entre oferta e produção é biologicamente irrealista (LAPIERRE et al., 2007; HANIGAN et al., 2018).

Schwab et al. (2009) e Whitehouse et al. (2009) reavaliaram os gráficos de dose/resposta de Lys e Met, e repetiram as mesmas análises estatísticas, com os mesmos bancos de dados do NRC (2001), gerando os mesmos gráficos de Lys e Met para outros softwares de formulação de dietas para vacas leiteiras baseados no modelo nutricional CNCPS, como CPM-Dairy e AMTS. Segundo os autores, esperava-se que devido as diferenças intrínsecas entre estes modelos, que as concentrações necessárias de Lys e Met na PM para a máxima produção de proteína do leite poderiam ser diferentes.

Como esperado, há diferenças entre os resultados obtidos com NRC (2001), CPM-Dairy e AMTS.Cattle (Tabela 1). Isso era esperado, já que os modelos diferem na abordagem de previsão de suprimento de AAs. Tais diferenças de abordagem levam a diferenças nos suprimentos previstos de PDR, PNDR, PM e na concentração de AAs na PM. O modelo de predição de AA no NRC (2001) é de natureza semi-fatorial, onde alguns dos parâmetros são determinados por regressão. Em contraste, o CPM-Dairy e o AMTS usam abordagens fatoriais

para prever fluxos de AAs para o intestino. A versão mais recente do CNCPS modificou os pools de carboidratos e as taxas de degradação de carboidratos das frações A1 e B1. As frações solúveis (por exemplo, açúcar e NNP) fluem com a fase líquida em vez da fase sólida, assim como as equações de taxa de passagem foram modificadas. O resultado dessas e de outras alterações levou a reduções na degradação ruminal dos carboidratos, aumentou o fluxo de PDR e reduziu o fluxo de PMic; em consequência também os fluxos previstos de Lys e Met para o intestino delgado.

TABELA 1 - PONTO DE INTERRUPÇÃO ESTIMADO PARA AS CONCENTRAÇÕES REQUERIDAS DE LYS E MET NA PM PARA CONTEÚDO E PRODUÇÕES MÁXIMAS DE PROTEÍNA DO LEITE PARA OS MODELOS NRC, CPM E AMTS USANDO A BASE DE DADOS DO NRC (2001) (SCHWAB ET AL., 2009, WHITEHOUSE ET AL., 2009)

	Modelo NRC		
	Ótima Lys	Ótima Met	Ótima Lys/Met
Conteúdo de proteína no leite (%)	7,24	2,38	3,0
Produção de proteína do leite (g/d)	7,08	2,35	3,0
Modelo CPM			
Conteúdo de proteína no leite (%)	7,46	2,57	2,9
Produção de proteína do leite (g/d)	7,51	2,50	3,0
Modelo AMTS			
Conteúdo de proteína no leite (%)	6,68	2,40	2,78
Produção de proteína do leite (g/d)	6,74	2,31	2,92

No recém-lançado NASEM (2021), particularmente duas mudanças foram muito importantes quando pensamos em fluxo de AAs para o intestino, e consequentemente balanceamento de AAs. A primeira delas foi a redução das proporções de PNDR dos alimentos, que como demonstrada por Hanigan et al. (2020), eram demasiadamente altas no modelo do NRC (2001). Assim, ao assumir taxas fixas de passagem para as frações B da proteína, adotadas no novo modelo, particularmente alimentos concentrados tiveram grande redução na expectativa de passagem de PNDR, e isso aumenta a contribuição da composição da PMic como porcentagem da PM, trazendo mudanças importantes na composição de AAs que teoricamente chegam no intestino. Concomitantemente, outra mudança importante foi a participação de protozoários na massa microbiana de proteína que flui para o intestino. O novo modelo assume 16,5% de participação, e isso impacta especificamente alguns AAs como Lys, que possuem

concentrações quase duas vezes maior em protozoários comparativamente a bactérias (JENSEN et al., 2006; FESSENDEN et al., 2017). Tais alterações do modelo nutricional podem mudar o modo com que olhamos para alguns AAs e suas possíveis deficiências frente ao requerimento/suprimento.

Quando pensamos a respeito das exigências de AAs de uma vaca leiteira, principalmente de animais no periparto, alguns trabalhos têm nos sugerido que o perfil de AAs exigidos pelos animais não é constante em todas as fases de vida e de produção. Este seria o resultado de fatores como, quais processos biológicos estão ocorrendo mais assiduamente e geram maiores demandas de AAs no organismo, da deficiência prévia destes animais, assim como da composição da dieta que é ofertada.

Além do balanço energético negativo (BEN), muito discutido nas últimas décadas, um balanço proteico negativo (BPN) no pós-parto imediato, às vezes de igual ou até maior relevância que o BEN, tem sido agora caracterizado e discutido. Estima-se que o nadir ou ponto mínimo do balanço proteico negativo pós-parto ocorra em torno do sétimo dia; depois disso diminuindo sua magnitude e se tornando positivo até a quarta semana pós-parto (BELL et al., 2000). A proteína disponível neste período parece ser particionada para propósitos glicogênicos apenas no período pós-parto imediato, uma vez que os AAE não contribuem mais para a liberação de glicose hepática em caráter líquido no período pós-parto (LARSEN e KRISTENSEN, 2013).

Com objetivo de estudar a magnitude deste BPN e do metabolismo de AAs em vacas recém-paridas, Larsen et al. (2014) infundiram caseína no abomaso de vacas leiteiras de modo a suprir todo o déficit de proteína metabolizável estimada até o 29º dia após o parto, ou seja, reduzir o balanço de proteína metabolizável para próximo a zero. A produção de leite foi aumentada em impressionantes 7,2 kg/dia de 1 a 29 DEL, bem como a produção de proteína do leite foi incrementada em 452,43 g/dia. Segundo os autores, a redução de apoptose precoce de células alveolares após o parto pode explicar parte do aumento e, principalmente, da persistência do incremento de produção, mesmo após o término do período de infusão de caseína, uma vez que houve maior fornecimento de nutrientes para as células mamárias.

Um ponto que nos chama muita atenção nos experimentos citados acima, é que os AAs mais deficientes para estes animais não foram Met e Lys como estamos acostumados a discutir, mas sim leucina (Leu). Com tal evidência, outro grupo de pesquisadores (YEPES et al., 2019) investigaram os efeitos da suplementação de AAs de cadeia ramificada (Leu, Ile e Val) em vacas recém-paridas, porém não encontraram nenhum efeito, além do aumento circulante destes AAs no plasma frente a suplementação. Mais recentemente, Tebbe e Weiss (2021) investigaram a resposta de primíparas e múltiparas ao serem alimentadas com dietas adequadas em PM no

pós-parto imediato com um blend de AAs (Met, Lys e His), comparativamente a uma dieta convencional (e muito comum de ser encontrada alimentando vacas recém paridas em fazendas comerciais), com 16,9%PB. Uma observação importante é que, para conseguir chegar ao balanço adequado de PM, os pesquisadores avaliaram uma dieta com 20%PB, com adição de um blend de PNDR e AAs. A resposta em produção comparando a dieta convencional com a PM ajustada foi de 2 e 5 kg a mais de leite corrigido para energia, para primíparas e múltiparas, respectivamente. Outro ponto interessante foi a redução de marcadores de BPN em animais alimentados adequadamente para sua demanda de PM.

Ainda tratando de vacas no período de transição, normalmente estas apresentam um aumento na lipólise do tecido adiposo devido a alterações hormonais, como redução da insulina circulante (e aumento da insensibilidade do tecido adiposo, conhecida por resistência a insulina), aumento das catecolaminas e do glucagon e aumento do hormônio do crescimento. Por consequência aumentam as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue, além da grande demanda que se inicia para a produção de leite. Para que o aproveitamento máximo desses ácidos graxos livres ocorra e a saúde hepática também seja preservada, a via metabólica que leva a oxidação completa destes compostos seria desejada. Uma organela importante dentro dos hepatócitos onde este processo ocorre é a mitocôndria, e a carnitina é fundamental para o transporte de AGNE a partir do citosol para o interior das mitocôndrias, onde ocorre a β -oxidação (DRACKLEY, 1999). A metionina é requerido para a síntese de carnitina (CARLSON et al., 2007); portanto, a maior concentração hepática de carnitina (82,1 vs. 37,5 nmol/g de tecido) que foi detectada em vacas suplementadas com Met indica uma maior biodisponibilidade desta para a síntese de carnitina (OSORIO et al., 2014). Do mesmo modo, Tang et al. (2015) identificaram grande dependência de Met para a biossíntese de carnitina em cultura celular. A via de biossíntese deste AA já é bem estudada e esclarecida, e demonstra em sua via metabólica a dependência do aminoácido metionina (REBOUCHE, 1988), sugerindo um possível maior aproveitamento por alguns tecidos como muscular e hepático em oxidar lipídeos para a obtenção de energia, tornando o animal mais eficiente.

A Met também é um aminoácido essencial envolvido no transporte de lipídios do tecido hepático para outros tecidos como a glândula mamária, auxiliando na síntese de apolipoproteínas utilizada na estrutura de formação das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Especificamente sugere-se que desempenha papel vital na transferência de unidades de carbono em vacas leiteiras, modulando a síntese de S-adenosilmetionina (SAM) no ciclo de 1 Carbono, e este funciona como um doador de grupos metil na formação de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (OSORIO et al., 2014).

Outros pesquisadores sugerem que Histidina (His) é provavelmente um potencial AA limitante após Lys e Met, particularmente quando as vacas são alimentadas com dietas com baixo teor de PB (deficientes em PM), com dietas baseadas em silagem de milho e alfafa (LEE et al., 2012; GIALLONGO et al., 2016). Esta potencial deficiência faz sentido quando observamos o baixo conteúdo de His nas bactérias e protozoários sintetizados no rúmen em comparação com o leite (NRC, 2001; SOK et al., 2017). Possivelmente quanto maior for a contribuição da PMic no total de PM fornecido diariamente para os animais, maior será a deficiência de His.

Importante ressaltar que determinar a deficiência de um AA é dependente basicamente do seu fluxo de entrada em um sistema, frente ao fluxo de saída ou acreção do mesmo. Em vacas leiteiras, entendemos que o fluxo intestinal é determinado tanto pela composição da proteína dietética como pela participação e composição da PMic. Tais estimativas e balanços precisam ser feito por nutricionistas com auxílio de um modelo matemático que, na melhor das hipóteses, será próximo a realidade para um certo grupo de animais similar aos que foram utilizados para desenvolver o modelo. Isso nos leva a diversos questionamentos, que se acentuam ao comparar tais balanços entre os diversos modelos nutricionais disponíveis. Alguns pontos discutidos acima nos fazem refletir a respeito do real requerimento e/ou deficiência de diversos aminoácidos, uma vez que modelos mais atualizados e, teoricamente mais precisos para refletir o processo biológico, sugerem que algumas teorias assumidas como verdadeiras a décadas, hoje são no mínimo questionáveis.

2.4 APORTE DE AMINOÁCIDOS E DESEMPENHO DE VACAS EM LACTAÇÃO

A resposta ainda mais frequentemente encontrada, e facilmente mensurada, nos experimentos que suplementam ou realizam balanceamento de AAs é o aumento do percentual de proteína do leite e citaremos 3 meta-análises para abordarmos tais resultados. No seu estudo meta-analítico, Vyas e Erdman (2009) avaliaram o efeito do suprimento de Lys e Met em g/d de 23 estudos publicados com vacas em lactação. As respostas observadas de proteína do leite ao consumo diário de Met foi de 4 g de proteína verdadeira do leite por grama de ingestão metabolizável de Met, dentro de um banco de dados com variação de 25 a 70 g por vaca/dia de Met. Da mesma forma, as respostas de proteína do leite à Lys foram de 3,2 g de proteína do leite por grama de ingestão de Lys metabolizável, com variação de consumo de Lys entre 80 a 203 g por vaca/dia.

Na meta-análise conduzida por Patton (2010), 35 estudos foram utilizados para avaliar os efeitos dos níveis de Lys e Met na PM nas respostas em produção de leite e proteína do leite.

Neste estudo temos uma interessante comparação das dietas quanto aos diferentes cenários onde a dieta apresentava deficiência ou não dos dois aminoácidos segundo o modelo matemático, e a resposta desta frente a suplementação. No geral, a adição de Met às dietas aumentou a produção de proteína do leite, tanto em porcentagem (0,07%) quanto em rendimento (27 g/d). O consumo de MS diminuiu levemente, enquanto a produção de leite aumentou de maneira muito tímida. Quando as vacas com um balanço positivo previsto de AAs foram suplementadas com Met, a produção de leite aumentou, mas quando o balanço de AAs na dieta foi negativo, a produção de leite foi reduzida. O autor ressaltou que nenhuma evidência dá suporte a necessidade de um alto nível de Lys como pré-requisito para obter uma resposta na proteína do leite frente ao suprimento de Met, como sugerido pelo modelo do NRC (2001).

Mais recentemente, Lean et al. (2018) utilizaram as predições de fluxo de AAs do modelo CNCPS em sua meta-análise de 63 experimentos, com o objetivo de analisar os efeitos do suprimento metabolizável de AAs no desempenho de vacas leiteiras. O aporte de Met metabolizável (g/d) previsto pelo CNCPS foi associado forte e positivamente a porcentagem e produção de proteína do leite, mesmo com pequenas variações no aporte (51,91g vs. 56,96 g/d). A produção de leite, entretanto, foi associada positivamente com His, Leu e Trp. O rendimento de proteína verdadeira do leite também foi associado aos níveis de Leu metabolizável, enquanto novamente Lys prevista em g/d não alterou o desempenho dos animais. Os níveis de Lys metabolizável, porém, foram menores do que os normalmente recomendados, bem como a alteração com as suplementações foram muito pequenas (157 g vs. 162 g).

Recentemente, um trabalho realizado por pesquisadores da Universidade de Illinois (FEHLBERG et al., 2020), suplementando grandes quantidades de Lys (7,15%PM) em vacas no período de transição, conseguiram respostas bem diferentes, com aumentos significativos de produção de leite corrigida para energia. Ainda existem diversas lacunas em aberto quando se estuda Lys, e certamente um dos questionamentos são os níveis de suprimento intestinal deste aminoácido necessário para observarmos resposta, bem como a qualidade da proteção dos produtos disponíveis no mercado. Assumindo o novo NASEM (2021), o aumento considerável de Lys na PMic devido a maior participação de protozoários na sua composição, juntamente com a maior dependência da PMic para o fluxo total de PM, como já discutido em tópicos anteriores, sugerem que talvez a ausência de resposta ou minimamente sua inconstância em diversos experimentos nos últimos 20 anos frente a suplementação ou ao balanceamento de Lys, com um incremento médio de 5,7 para 6,4% de Lys na PM em dietas com 16,6%PB e consumo médio de 2775 g/d de PM estimados pelo NRC (2001) (MORRIS e KONONOFF, 2020; GIALLONGO et al., 2016; BERNARD et al., 2014; LI et al, 2014; PAZ et al., 2013; MULLINS et al., 2013; WANG et al., 2010; SWANEPOEL et al., 2010), possa ser apenas um

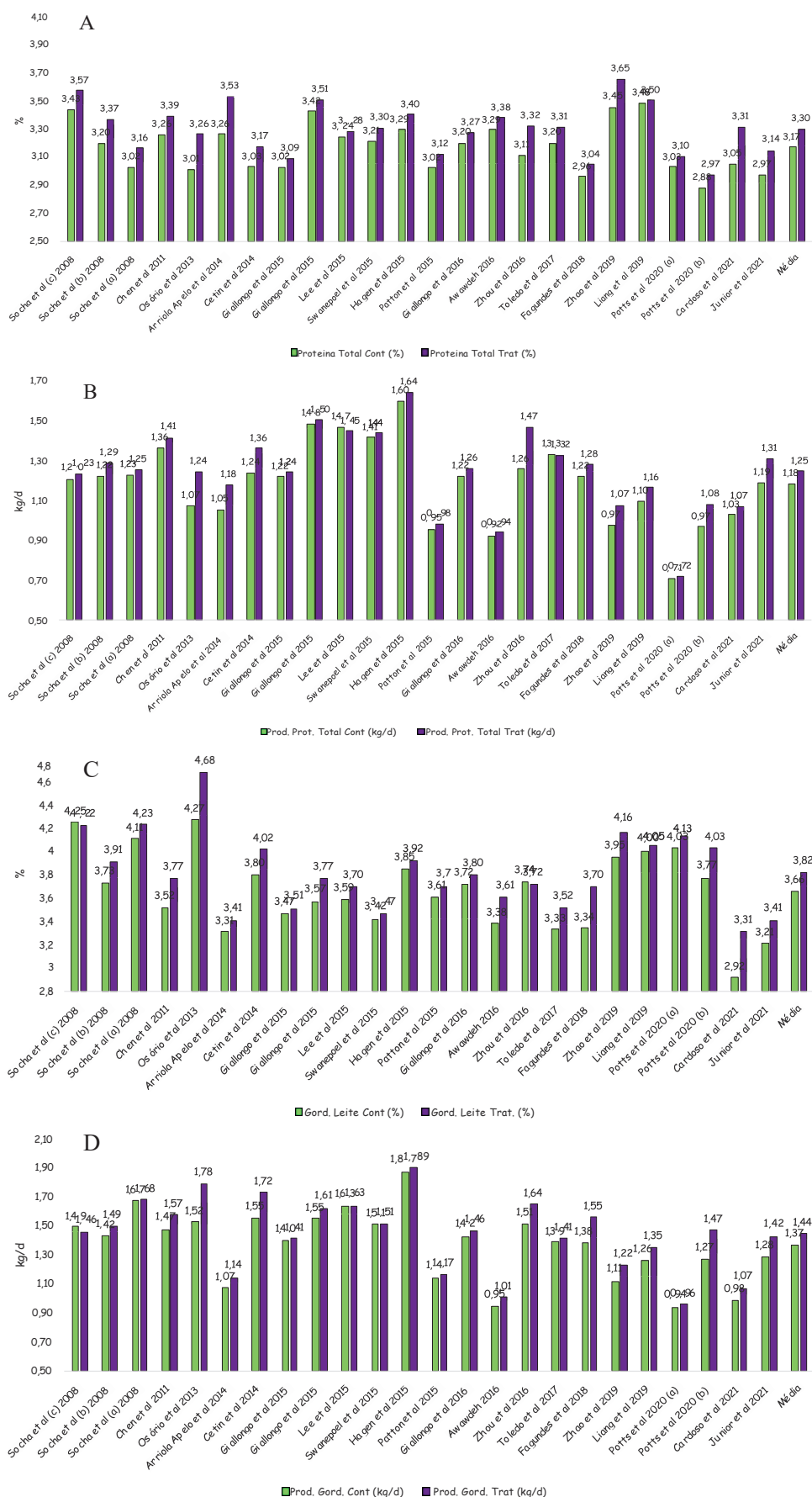
reflexo de um erro nas estimativas dos modelos anteriores ao predizer fluxo intestinal deste AA, e por consequência de sugeri-lo como deficiente em dietas baseadas em farelo de soja como principal fonte proteica.

Poucos experimentos têm sido conduzidos com outros AAs, como por exemplo Leu e Ile. Destacamos o recente experimento conduzido por Yoder et al. (2020) investigando efeitos produtivos do maior aporte destes AAs via infusão jugular em vacas de meio de lactação. Além do maior aporte de Leu e Ile trazer aumento da produção de leite corrigida para energia, ele nos traz de modo muito evidente um conceito que já abordamos anteriormente, o de que cada AA possui respostas independentes e aditivas na produção de proteína do leite por exemplo, e não associadas.

O aumento da produção de proteína e de caseína do leite com a suplementação de Met já é bem descrito na literatura, porém mais recentemente, a maior produção de gordura do leite também começou a ser notada em alguns experimentos. Com intuito de entender tais respostas, revisamos os resultados de 24 comparações publicadas nos últimos 15 anos com suplementação de uma fonte de metionina protegida ruminalmente ou infundida, resultando em um banco de dados com 1294 vacas, com DEL médio de $84,5 \pm 50,7$ dias e produtividade de $37,4 \pm 6,1$ kg/d, alimentadas com dietas com $16,2 \pm 1,3\%$ PB, com um contraste de $1,83\%$ Met (%PM) nos tratamentos controle para $2,31\%$ Met (%PM) nos lotes considerados tratamento.

Os dados sugerem um aumento médio de 0,13 pontos percentuais no teor de proteína do leite (+61g/dia de proteína), concomitante a um aumento de 0,16 pontos percentuais no teor de gordura do leite (+80g/dia de gordura) (Figura 1) (JUNIOR et al., 2021; CARDOSO et al., 2021; POTTS et al., 2020; LIANG et al., 2019; ZHAO et al., 2019; FAGUNDES et al., 2018; TOLEDO et al., 2017; ZHOU et al., 2016; AWAWDEH, 2016; GIALLONGO et al., 2016; PATTON et al., 2015; HAGEN et al., 2015; SWANEPOEL et al., 2015; LEE et al., 2015; GIALLONGO et al., 2015; CETIN et al., 2014; ARRIOLA APELO et al., 2014; OSORIO et al., 2013; CHEN et al., 2011; SOCHA et al., 2008). Diversas evidências sugerem alguns vínculos entre o suprimento de aminoácidos do organismo com o metabolismo lipídico, e tentaremos discutir algumas possibilidades na sequência deste texto.

FIGURA 1 - EFEITO DO MAIOR APORTE DE MET SOBRE PERCENTUAL (A) E PRODUÇÃO (B) DE PROTEÍNA TOTAL DO LEITE, BEM COMO PERCENTUAL (C) E PRODUÇÃO (D) DE GORDURA DO LEITE EM 24 COMPARAÇÕES PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS 15 ANOS.



Para crescer e se dividir, as células devem aumentar a produção de proteínas, lipídios e nucleotídeos, ao mesmo tempo em que suprimem as vias catabólicas. O controle nutricional da produção de proteínas na glândula mamária depende da regulação da tradução do mRNA. Uma via celular que foi estabelecida como integral para a regulação da tradução das proteínas está centrada em torno do alvo mecanicista do complexo 1 de rapamicina (mTORC1). Este complexo quinase é composto pela proteína quinase serina/treonina mTOR e seus parceiros de ligação: mamífero letal com proteína SEC13 8 (mLST8), necessária para a montagem do complexo, proteína associada reguladora de mTOR (Raptor), uma proteína de ligação ao substrato, Dishevelled, Egl-10 e domínio Pleckstrin contendo a proteína de interação mTOR (DEPTOR), uma proteína reguladora e substrato Akt rico em prolina (PRAS40) (KENNEDY e LAMMING, 2016). O complexo mTORC1 desempenha um papel central na regulação de todos os processos de síntese e catabolismo e, portanto, controla o equilíbrio entre estes dois perante condições ambientais (SAXTON e SABATINI, 2017). A proteína mTOR é formada de dois complexos proteicos denominados complexo 1 da mTOR (mTORC1) e complexo 2 da mTOR (mTORC2). O mTORC1 modula a tradução em resposta a nutrientes, hormônios e fatores de crescimento. Além do hormônio do crescimento e insulina, AAs essenciais também demonstraram estimular a fosforilação de mTORC1 em fragmentos de tecido mamário bovino (ARRIOLA et al., 2014). Curiosamente, os aminoácidos essenciais, individualmente, afetaram de forma independente o estado de fosforilação de mTORC1, e estas alterações foram correlacionadas com mudanças nas taxas de síntese de caseína em fragmentos de tecido mamário. O estado de energia da célula (relação ATP/ADP) inibe mTORC1 quando a célula está em estresse energético, uma vez que a síntese de proteínas é um processo que consome energia. No entanto, esse caminho parece ser menos relevante à ativação do mTORC1 que os aminoácidos, uma vez que os fragmentos de tecido responderam com maior fosforilação de mTORC1 e taxa de síntese de caseína para estes nutrientes, independentemente da presença de acetato ou glicose no meio (APPUHAMY et al., 2014). Basicamente o mTORC1 ativo fosforila substratos, incluindo entre outros, proteína ribossomal S6 quinase β -1rp (S6K1) (HOLZ et al., 2005), fator de iniciação de tradução eucariótica 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (GINGRAS et al., 2001) e Unc-51 quinase ativadora de autofagia semelhante (ULK1) (HOSOKAWA et al., 2009). Assim, ao controlar a atividade de seus substratos, o mTORC1 estimula os processos anabólicos, incluindo a biogênese ribossômica e a tradução de mRNA.

Uma interação possível dos aminoácidos na lipogênese foi observada usando hepatócitos de truta arco-íris, onde metionina e lisina juntamente a insulina não apenas alteraram a sinalização mTOR, mas também a expressão de enzimas ligadas à produção de

ácidos graxos, como a enzima ácido graxo sintase (FAS) (LANSARD et al., 2010). Já havia sido demonstrado em estudo anterior (LANSARD et al., 2010), usando cultura de células primárias de hepatócitos, que os aminoácidos regulavam o metabolismo hepático a nível molecular em combinação com a insulina. Este estudo mostrava que os aminoácidos isolados ou em conjunto com a insulina foram capazes de regular a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídios, por um padrão que incluía uma dramática regulação positiva dependente de mTOR. Com tal hipótese, Li et al. (2016) cultivaram células mamárias de bovinos com diversas relações de aminoácidos, e observaram a expressão gênica de diversas enzimas da síntese de ácidos graxos, envolvidas na síntese de cadeias de diferentes tamanhos de carbono, potencialmente ligadas a sinalização pela mTOR, observando as maiores respostas quando as células foram cultivadas em meios com concentrações teoricamente ótimas de todos os aminoácidos essenciais.

Mais recentemente, um grupo de pesquisadores com o objetivo de avaliar apenas o efeito da concentração de Met das células desta vez de tecido mamário, sobre a ativação do mTORC1 e seus possíveis mecanismos de aumento da expressão de genes ligados ao complexo enzimático da síntese *de novo* da gordura do leite, cultivaram tais células em meios com diferentes concentrações de Met, e observaram em uma concentração de 0,6 mM/L as maiores expressões de SREBP, relação mTORC1 fosforilada e não fosforilada, bem como a maior produção de triacilglicerol (QUI et al., 2018).

De modo geral, a proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1) é um fator de transcrição que controla a expressão de vários genes lipogênicos e é um regulador central da síntese de gordura do leite. A SREBP-1 é sintetizada como precursor (forma completa de SREBP-1, fSREBP-1) no retículo endoplasmático e pode ser ativado no aparelho de Golgi em um fragmento ativo do N terminal, que entra no núcleo e inicia a transcrição de genes relacionados a síntese de ácidos graxos. Os co-ativadores de transcrição regulada por CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP), são compostos por três membros, sendo que dentre eles, CRTC2 está presente em todos os tecidos de mamíferos. CRTC2 é o principal mediador da transcrição dependente de CREB. Estudos com cultura celular de tecido mamário bovino demonstram que Met marcadamente aumenta a expressão de CRTC2 e sua translocação nuclear, porém não alteram sua forma fosforilada. A super-expressão de CRTC2 por sua vez aumenta a expressão de SREBP-1c, bem como sua ativação. Ao adicionar Met em meio com bloqueio de CRTC2, claramente existe perda do efeito estimulatório deste na expressão e atividade da SREBP-1. A maior concentração celular de Met aumenta a proporção de mTOR fosforilada/mTOR não fosforilada, mas não sua abundância. Quando p-mTOR é bloqueada com a utilização de rapamicina por exemplo, a expressão de CRTC2 também é amplamente

reduzida, indicando que a estimulação de CRTC2 por AAs se dá diretamente pela maior atividade da mTOR (LI et al., 2019). Em resumo, a Met na célula estimula a ativação de mTOR (fosforilação), e esta por sua vez desfosforila CRTC2 no citoplasma, o translocando para o núcleo, e este desfosforilado atua através da transcrição do mRNA da SREBP-1 e de sua ativação. Por consequência, enzimas relacionadas a cascata de síntese de ácidos graxos são mais amplamente sintetizadas.

Outras rotas que têm sido exploradas é o mTOR regulando a atividade do SREBP-1 pelo controle da entrada nuclear de Lipin1 via fosforilação. A Lipin1 não fosforilada entra no núcleo e, através de um mecanismo ainda desconhecido, inibe a atividade do SREBP-1, reduzindo a lipogênese. No entanto, quando a Lipin1 é fosforilada pelo p-mTOR, a entrada desta no núcleo é bloqueada, evitando a inibição da SREBP-1 (OSORIO et al., 2016).

Claramente o mTORC1 desempenha um papel central na promoção da biogênese lipídica, regulando a expressão de muitos genes lipogênicos, principalmente de uma família importante de fatores de transcrição que estão envolvidos na síntese lipídica composta pelas proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBPs) (LAPLANTE e SABATINI, 2009). Estas proteínas SREBPs são fatores de transcrição de zíperes de Leu hélice-alça-hélice básicos, que regulam a homeostase lipídica pelo controle da expressão de vários genes lipogênicos. A importância dos SREBPs na lipogênese foi destacada por estudos usando camundongos com deleção específica do fígado, que exibem redução no processamento de SREBPs, colesterol e síntese de ácidos graxos no fígado (CARON et al., 2015).

Além das possíveis interações pós absorptivas descritas acima, a metionina também é um aminoácido envolvido no transporte de lipídios no tecido hepático para outros tecidos como a glândula mamária, principalmente em animais sobre condição de grande mobilização lipídica como vacas recém paridas, auxiliando na síntese e formação da VLDL. Especificamente sugere-se que desempenha papel vital na transferência de unidades de carbono em vacas leiteiras, modulando a síntese de S-adenosilmetionina (SAM) no ciclo de 1 Carbono, e este atua como o mais importante doador de grupos metil na formação de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (OSORIO et al., 2014).

As evidências da relação existente entre metabolismo aminoacídico e síntese lipídica descritas nos últimos parágrafos também foi incorporada no NASEM (2021), na equação de predição da produção de gordura do leite. Basicamente a equação prediz uma resposta de 1,45 g/dia e 1,34 g/dia para cada g de Ile e Met absorvíveis, respectivamente. Similarmente, Daley et al. (2019) utilizando uma metodologia linear meta analítica propôs a relação do fluxo de AAs com a produção de gordura do leite, e sugeriu que Ile, Lys e Met foram significativos para predizer a produção diária de gordura no leite.

2.5 INTERAÇÃO ENTRE AMINOÁCIDOS E ENERGIA

As respostas esperadas ao aumento do suprimento de algum AA, até pouco tempo atrás era compreendido por modelos nutricionais como uma resposta dependente apenas do substrato em si, ou seja, do aporte do AA em questão, assumindo que essa resposta seria, invariavelmente, um produto de seu fluxo por uma eficiência fixa de utilização. É notável que tal afirmação não reflete respostas biológicas, e isso tem sido demonstrado em diversos estudos (LAPIERRE et al., 2020; DANIEL et al., 2016). Além do fornecimento de AAs propriamente dito, o fornecimento de energia também tem impacto na eficiência de uso destes AAs. Incrementos na produção de proteína do leite foram observados em resposta ao fornecimento de energia pós-ruminal, seja como glicose (DANES et al., 2020; NICHOLS et al., 2016), propionato (RAGGIO et al., 2006) ou gordura protegida ruminalmente (NICHOLS et al., 2018), embora os resultados com esta última fonte de energia ainda sejam inconsistentes.

Espera-se que o incremento de produção de proteína em resposta ao aumento da oferta de energia pós-ruminal aumente também a eficiência de utilização da proteína dietética. Utilizando 825 médias de tratamentos, DANIEL et al. (2016) concluíram que tanto a PM quanto a energia líquida da lactação (EL_{lac}) fornecem aumentos não apenas de proteína do leite, mas também de gordura e lactose, sendo os efeitos aditivos, como observado na maioria dos estudos individuais onde a interação foi testada.

O efeito observado sobre a produção de proteína do leite em tratamentos de mais alta energia, sendo esta oriunda de carboidratos de alta digestibilidade, pode ser explicada pelo aumento da oferta de AAs no intestino devido ao maior fluxo de proteína microbiana fluindo do rúmen em resultado a maior disponibilidade de carboidratos fermentáveis (BRODERICK, 2003). No entanto, a infusão intravenosa de insulina (MACKLE et al., 1999) e a infusão pós-ruminal de glicose (RULQUIN et al., 2004) e amido (RIUS et al., 2010) também foram suficientes para aumentar a produção de proteína do leite, sugerindo efeito não apenas de caráter ruminal como substrato para crescimento de massa microbiana, mas também direto no processo de síntese na glândula mamária. Tanto AAs como fontes energéticas podem funcionar diretamente ou indiretamente, induzindo a respostas hormonais como insulina por exemplo, como moléculas sinalizadoras que alteram as vias de transdução e que regulam as taxas de síntese de diversas proteínas na glândula mamária. Alguns experimentos *in vitro* demonstram claramente que AAE, glicose e insulina podem estimular a síntese de proteínas do leite de forma independente e aditiva, porém não interativa (APPUHAMY et al., 2011, 2012; ARRIOLA

APELO et al., 2014; YODER et al., 2020). Tais evidências podem nos sugerir diferentes estratégias nutricionais para não apenas maximizar a produção de sólidos do leite, mas também otimizar a eficiência de uso da proteína dietética.

Que ambos, energia e aminoácidos devem ser ajustados em conjunto no momento da formulação de dietas está bem estabelecido, porém como as diferentes fontes de energia podem alterar a eficiência de resposta e uso dos AAs, ainda é discutível. A grande maioria do conhecimento sobre a interação entre estes sistemas tem sido gerada e mecanicamente compreendida falando sobre fontes energéticas glicogênicas, ou que podem causar alguma resposta insulinêmica nos animais. Porém, como diferentes perfis energéticos, por exemplo lipídicos ou de carboidratos não glicogênicos, interagem sobre diferentes fluxos de aminoácidos ainda é inconclusivo e carente de estudos.

2.6 CONCLUSÃO

O conceito de AAs vistos como blocos de construção, adotado em teorias de aminoácidos limitantes, vem sendo continuamente questionados e cada vez mais evidenciado suas limitações. Ao entendermos que estas moléculas não participam apenas da formação de proteínas do leite, mas que desempenham funções chaves dentro do processo de transcrição de todas as proteínas de uma célula, isso quer dizer, desde proteínas estruturais a proteínas de funções ativas como enzimas, passamos a investigar mais a fundo quais os mecanismos envolvidos nas demais respostas que o correto balanceamento de AAs em dietas de vacas leiteiras pode nos proporcionar. Não apenas do ponto de vista biológico, esta mudança de conceito e conhecimento traz novas abordagens práticas na formulação de dietas para vacas leiteiras, abrindo novas oportunidades de estratégias de balanceamento de AAs para otimizar a produção não apenas de proteína, mas também gordura do leite e saúde das vacas. Mais adiante, a relação entre energia e AAs, seja ela na modulação da resposta ou eficiência de uso da proteína dietética, se mostra promissora. Porém, muitas lacunas ainda permanecem em aberto referente a esta abordagem, como por exemplo se a dependência desta relação se dá basicamente a respostas insulinêmicas ou a glicose, ou se também outras fontes que forneçam o mesmo aporte calórico induzem as mesmas modulações sugeridas por estudos prévios. Adotar, melhor compreender e modelar tais interações possíveis dentro do metabolismo nos trouxe um novo e amplo aspecto de combinações para otimizar não apenas desempenho, mas eficiência do uso dos nutrientes na nutrição de vacas leiteiras.

2.7 REFERÊNCIAS

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 598–1624, 2000.

APELO, S. A.; KNAPP, J. R.; HANIGAN, M. D. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 4000-4017, 2014.

APPUHAMY, J. A. D. R. N. et al. Effects of jugular-infused lysine, methionine, and branched-chain amino acids on milk protein synthesis in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 1952-1960, 2011.

ARDALAN, M.; REZAYAZDI, K.; DEHGHAN-BANADAKY, M. Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 94, p. 259-265, 2010.

AWAWDEH, M. S. Rumen-protected methionine and lysine: effects on milk production and plasma amino acids of dairy cows with reference to metabolisable protein status. *Journal of Dairy Research*, v. 83, p. 151-155, 2016.

BELL, A. W.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T. R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 59, p. 119-126, 2000.

BATEMAN II, H. G. et al. Accuracy and precision of computer models to predict passage of crude protein and amino acids to the duodenum of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 649-664, 2001.

BEQUETTE, B. J. et al. Amino acid exchange by the mammary gland of lactating goats when histidine limits milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 765–775, 2000.

BERNARD, J. K. et al. Response of cows to rumen-protected lysine after peak lactation. *The Professional Animal Scientist*, v. 30, p. 407-412, 2014.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1370–1381, 2003.

CARLSON, D. B.; WOODWORTH, J. C.; DRACKLEY, J. K. Effect of L-carnitine infusion and feed restriction on carnitine status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 2367-2376, 2007.

CARDOSO, F. et al. Effect of protein level and methionine supplementation on dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5467-5478, 2021.

CARON, A.; RICHARD, D.; LAPLANTE, M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, v. 35, p. 321-348, 2015.

CETIN, I. et al. Improved lactational performance in dairy cows supplemented with methionine or rumen-protected choline during the transition period. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, v. 24, p. 289-293, 2018.

CHEN, Z. H. et al. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 1978-1988, 2011.

DALEY, V. L.; BOMPADRE, T. F. V.; HANIGAN, M. D. Effects of absorbed amino acids on the milk fat yield: A meta-analytic approach. *Journal of Dairy Science*, v. 92, Suppl. 1, 2019.

DANES, M. A. C. et al. Post-ruminal supplies of glucose and casein, but not acetate, stimulate milk protein synthesis in dairy cows through differential effects on mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6218-6232, 2020.

DANIEL, J. B. et al. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal*, v. 10, p. 1975–1985, 2016.

DOEPEL, L. et al. Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 1279-1297, 2004.

DOEPEL, L. et al. Effect of postruminal glutamine supplementation on immune response and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 3107-3121, 2006.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2259-2273, 1999.

FAGUNDES, M. A. et al. Influence of supplementing a methionine derivative, N-acetyl-l-methionine, in dairy diets on production and ruminal fermentation by lactating cows during early to mid lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 7082-7094, 2018.

FEHLBERG, L. K. et al. Feeding rumen-protected lysine prepartum increases energy-corrected milk and milk component yields in Holstein cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 12, p. 11386-11400, 2020.

FESSENDEN, S. W. et al. Ruminal bacteria and protozoa composition, digestibility, and amino acid profile determined by multiple hydrolysis times. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 7211-7226, 2017.

FOX, D. G. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology*, v. 112, p. 29-78, 2004.

FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O. Predicting dietary amino acid adequacy for ruminants. *Amino Acids in Animal Nutrition*, p. 389, 2003.

GIALLONGO, F. et al. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, p. 3292–3308, 2015.

GIALLONGO, F. et al. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 4437-4452, 2016.

GINGRAS, A. C. et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & Development*, v. 15, p. 2852–2864, 2001.

GIRARD, C. L. et al. Effects of dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine on lactational performance and folate metabolism of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 660-670, 2005.

HAGEN, A.; MARTIN, R.; SHAVER, R. D. Effect of dietary monensin supplementation and amino acid balancing on lactation performance by dairy cows. *The Professional Animal Scientist*, v. 1, p. 278-283, 2015.

HAN, M.; ZHANG, M. The regulatory mechanism of amino acids on milk protein and fat synthesis in mammary epithelial cells: a mini review. *Animal Biotechnology*, v. 2, p. 1-11, 2021.

HANIGAN, M. et al. Predicting ruminally undegraded and microbial protein flows from the rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 10, p. 3168-19672, 2020.

HANIGAN, M. D. et al. Predicting post-absorptive protein and amino acid metabolism. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 47, 2018.

HOLZ, M. K. et al. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, v. 123, p. 569-580, 2005.

HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, p. 1981-1991, 2009.

JENSEN, C.; WEISBJERG, M.; HVELPLUND, T. Evaluation of methods for estimating the amino acid supply to the duodenum of microbial, endogenous and undegraded feed protein on maize silage diets fed to dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v. 131, p. 1-24, 2006.

JUNIOR, V. C. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLOS ONE*, v. 16, 2021.

KENNEDY, B. K.; LAMMING, D. W. The mechanistic target of rapamycin: the grand Conductor of metabolism and aging. *Cell Metabolism*, v. 23, p. 990-1003, 2016.

LANSARD, M. et al. L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *The Journal of Nutrition*, v. 141, p. 75-80, 2010.

LAPIERRE, H. et al. Review: Impact of protein and energy supply on the fate of amino acids from absorption to milk protein in dairy cows. *Animal*, v. 14, Suppl. 1, p. s87-s102, 2020.

LAPIERRE, H. et al. Amino acid requirements for lactating dairy cows: Reconciling predictive models and biology. In: *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, Dept. Anim. Sci., Cornell Univ., Ithaca, NY, p. 39-60, 2007.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 122, p. 3589-3594, 2009.

LARSEN, M.; LAPIERRE, H.; KRISTENSEN, N. B. Abomasal protein infusion in postpartum transition dairy cows: Effect on performance and mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 5608-5622, 2014.

LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*, v. 7, p. 1640-1650, 2013.

LEAN, I. J. et al. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 340-364, 2018.

LEE, C. et al. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 1885-1902, 2015.

LEE, C. et al. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 5253-5268, 2012a.

LEE, C. et al. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 6042-6056, 2012b.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LIANG, S. L. et al. Effect of N-acetyl-L-methionine supplementation on lactation performance and plasma variables in mid-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 5182-5190, 2019.

LI, P. et al. CRT2 is a key mediator of amino acid-induced milk fat synthesis in mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019.

LI, S. et al. Essential amino acid ratios and mTOR affect lipogenic gene networks and miRNA expression in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 7, p. 44, 2016.

LI, W. et al. Effect of distillers dried grains with solubles diet supplemented with rumen-protected lysine and methionine on milk production and milk amino acids in the lactating cow. *International Journal of Dairy Technology*, v. 67, 2013.

MACKLE, T. R. et al. Effects of insulin and amino acids on milk protein concentration and yield from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1512-1524, 1999.

MITCHELL, H. H.; BLOCK, R. J. Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *Journal of Biological Chemistry*, v. 163, p. 599-620, 1946.

MISCIATTELLI, L. et al. Milk production, nutrient utilization, and endocrine responses to increased postruminal lysine and methionine supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 275-286, 2003.

MORRIS, D. L.; KONONOFF, P. J. Effects of rumen-protected lysine and histidine on milk production and energy and nitrogen utilization in diets containing hydrolyzed feather meal fed to lactating Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 7110-7123, 2020.

MULLINS, C. R. et al. Short communication: Supplementing lysine and methionine in a lactation diet containing a high concentration of wet corn gluten feed did not alter milk protein yield. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 5300-5305, 2013.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE (NASEM). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press, 2021.

NICHOLS, K. et al. Feed and nitrogen efficiency are affected differently but milk lactose production is stimulated equally when isoenergetic protein and fat is supplemented in lactating dairy cow diets. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 7857-7870, 2018.

NICHOLS, K. et al. Glucose supplementation stimulates peripheral branched-chain amino acid catabolism in lactating dairy cows during essential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 1145-1160, 2016.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 958-969, 2003.

NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

O'CONNOR, J. D. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 1298-1311, 1993.

ORDWAY, R. S. et al. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5154-5166, 2009.

OSORIO, J. S.; LOHAKARE, J.; BIONAZ, M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics*, v. 48, p. 231-256, 2016.

OSORIO, J. S. et al. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 7437-7450, 2014.

OSORIO, J. S. et al. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postparturient cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248-6263, 2013.

PAZ, H. A. et al. Evaluation of rumen-protected lysine supplementation to lactating dairy cows consuming increasing amounts of distillers dried grains with solubles. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 7210-7222, 2013.

PACHECO, D. et al. Comparison of net portal absorption with predicted flow of digestible amino acids: Scope for improving current models? *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 4747-4757, 2006.

PATTON, R. A. et al. Relationships between circulating plasma concentrations and duodenal flows of essential amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 4707-4734, 2015.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2105-2118, 2010.

POTTS, S. B. et al. Production responses to rumen-protected choline and methionine supplemented during the periparturient period differ for primi- and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6070-6086, 2020.

PSZCZOLKOWSKI, V. L.; ARRIOLA APELO, S. I. The market for amino acids: understanding supply and demand of substrate for more efficient milk protein synthesis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 11, p. 108, 2020.

QI, H. et al. Methionine promotes milk protein and fat synthesis and cell proliferation via the SNAT2-PI3K signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 11027-11033, 2018.

RIUS, A. G. et al. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2034-2043, 2010.

RULQUIN, H. et al. Infusion of glucose directs circulating amino acids to the mammary gland in well-fed dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 87, p. 340-349, 2004.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B.; HUBER, J. T. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature review. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 3182-3213, 1998.

SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELL, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de (Org.). *Nutrição de Ruminantes*. 1. ed. Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandere Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, cap. 10, p. 255-284, 2006.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, v. 168, p. 960-976, 2017.

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-year review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10094-10112, 2017.

SCHWAB, C. G. et al. Reevaluation of the breakpoint estimates for the NRC (2001) required concentrations of lysine and methionine in metabolizable protein for maximal content and yield of milk protein. *Journal of Dairy Science*, v. 92, supl. 1, p. 103, 2009.

SCHWAB, C. G. et al. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 1254-1270, 1976.

SOCHA, M. T. et al. Extent of methionine limitation in peak-, early-, and mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 1996-2010, 2008.

SOCHA, M. T. et al. Improving intestinal amino acid supply of pre-and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1113-1126, 2005.

SOK, M. et al. Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 5241-5249, 2017.

ST-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 2487-2497, 2005.

SWANEPOEL, N. et al. Effects of ruminally protected methionine and/or phenylalanine on performance of high producing Holstein cows fed rations with very high levels of canola meal. *Animal Feed Science and Technology*, v. 205, p. 10-22, 2015.

SWANEPOEL, N. et al. Amino acid needs of lactating dairy cows: Impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v. 157, p. 79-94, 2010.

TANG, X. et al. Comprehensive profiling of amino acid response uncovers unique methionine-deprived response dependent on intact creatine biosynthesis. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 4, e1005158, 2015.

TEBBE, A. W.; WEISS, W. P. Concurrent and carryover effects of feeding blends of protein and amino acids in high-protein diets with different concentrations of forage fiber to fresh cows. 1. Production and blood metabolites. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5583-5600, 2021.

TOLEDO, M. Z. et al. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. *PloS One*, v. 12, n. 12, e0189117, 2017.

VYAS, D.; ERDMAN, R. A. Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5011-5018, 2009.

WANG, C. et al. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3661-3670, 2010.

WHITE, R. R. et al. Evaluation of the National Research Council (2001) dairy model and derivation of new prediction equations. 1. Digestibility of fiber, fat, protein, and nonfiber carbohydrate. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 3591-3610, 2017.

WHITEHOUSE, N. et al. Comparison of optimal lysine and methionine concentrations in metabolizable protein estimated by the NRC (2001), CPM-Dairy (v.3.0.10) and AMTS. Cattle (v.2.1.1) models. *Journal of Dairy Science*, v. 92, suppl. 1, p. 103, 2009.

YEPE, F. L. et al. Effect of rumen-protected branched-chain amino acid supplementation on production- and energy-related metabolites during the first 35 days in milk in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 6, p. 5657-5672, 2019.

YODER, P. S. et al. Effects of jugular infused methionine, lysine, and histidine as a group or leucine and isoleucine as a group on production and metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 2387-2404, 2020.

ZHAO, K. et al. Effects of rumen-protected methionine and other essential amino acid supplementation on milk and milk component yields in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 7936-7947, 2019.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8716-8732, 2016.

3 CAPÍTULO II: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE, ASSOCIADA OU NÃO A UMA FONTE LIPÍDICA DE ENERGIA, SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO

Resumo

O balanceamento de dietas por aminoácidos vem sendo difundido em fazendas leiteiras ao passo que pesquisas tem sugerido a interação entre os metabolismos proteico e energético na fisiologia de vacas leiteiras. Dessa forma o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, associada ou não a uma fonte extra de gordura predominantemente saturada, sobre o desempenho produtivo, metabólico e sobre o processo de síntese de gordura do leite em vacas de alta produção no meio da lactação. Utilizou-se no experimento 112 vacas multíparas da raça Holandês com média de $2,8 \pm 0,7$ lactações, $184,7 \pm 66,8$ dias em lactação, $49,1 \pm 6,7$ kg/d de leite, $4,04 \pm 0,65$ %G e $3,17 \pm 0,22$ %P. Os animais foram alocados em blocos em arranjo de tratamento fatorial em um dos 4 tratamentos: Controle, sem suplementação de gordura ou Met (CONT); Alta energia, com suplementação de gordura hidrogenada, porém sem Met (AE); Controle, sem suplementação de gordura, porém com suplementação de Met (MET); Alta energia, com suplementação de gordura hidrogenada e com suplementação de Met (METAE). O período experimental total foi de 38 dias, sendo os três primeiros dias utilizados para coleta de dados como covariáveis. As variáveis mensuradas foram produção e composição do leite, parâmetros sanguíneos e perfil de ácido graxos no leite. O grupo AE produziu mais leite ($1,5$ kg/d; $P=0,02$), mais leite corrigido para energia ($2,0$ kg/d; $P<0,01$) e também se observou aumento na excreção de energia diária no leite ($1,5$ Mcal/d; $P<0,01$). A suplementação de MET aumentou a produção leite corrigida para energia ($0,75$ kg/d; $P=0,01$) e a excreção de energia diária no leite ($1,46$ Mcal/d; $P<0,01$). A concentração de proteína do leite foi incrementada pela suplementação de MET ($3,30$ vs. $3,11$ %; $P<0,01$) em relação aos animais do grupo CONT, porém a produção diária de proteína teve resposta para ambos os tratamentos, sendo que as suplementações de MET e AE aumentaram ($P<0,01$) 80 e 70 g/d de proteína do leite, respectivamente. A concentração de gordura do leite apenas aumentou pela MET ($+0,26$ pontos percentuais; $P<0,01$). Já a produção diária de gordura, assim como na produção de proteína, apresentou efeito significativo tanto para MET como AE, porém com menor magnitude da suplementação lipídica comparativamente ao efeito do AA ($+190$ g/d vs. $+80$ g/d; $P<0,01$ e $P=0,05$, respectivamente). Com relação ao perfil de ácidos graxos no leite, o tratamento AE reduziu a proporção de C16:0

e aumentou as proporções de C18:1 c11, C18:3 n3 e C17:0. Já o tratamento MET também reduziu a proporção de C16:0, porém aumentou significativamente a proporção de diversos mono e poli-insaturados (C18:1 c9, C18:1 c11 e C18:1 c13).

Abstract

The balancing of diets by aminoacids has been widespread in dairy farms while research has suggested the interaction between protein and energy metabolism in the physiology of dairy cows. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of rumen-protected methionine supplementation, associated or not with an extra source of highly saturated fat, on productive, metabolic performance and milk fat acid composition in mid-lactation. In the experiment, 112 multiparous Holstein cows with a mean of 2.8 ± 0.7 lactations, 184.7 ± 66.8 days in lactation, and 49.1 ± 6.7 (kg/d) of milk, 4.04 ± 0.65 Fat%, 3.17 ± 0.22 P%. The animals were allocated in blocks in a factorial treatment arrangement in one of 4 treatments: Control, without fat or Met supplementation (CONT); High energy, with hydrogenated fat supplementation, but without Met (AE); Control without fat supplementation, but with Met supplementation (MET); High energy, with hydrogenated fat supplementation and with Met supplementation (METAE). The total experimental period was 38 days, the first three days data was used as covariates. The variables measured were milk production and composition, blood parameters, and fatty acid composition in milk. The AE group produced more milk 1.5 kg/d; $P=0.02$, more milk corrected for energy 2.0 kg/d; $P<0.01$, and we also observed an increase in the daily energy excretion in milk 1.5 Mcal/d; $P<0.01$. MET supplementation increased milk production corrected for energy 0.75 kg/d; $P=0.01$, and the daily energy excretion in milk 1.46 Mcal/d; $P<0.01$. Milk protein concentration was affected by higher MET supplementation 3.11 vs. 3.30 $P<0.01$, but daily protein production responded to both effects, with MET and AE supplementation increasing by 80 and 70 g/d protein, respectively $P<0.01$. Milk fat concentration increased only by MET, with 0.26 percentage points $P<0.01$; on the other hand, fat daily production on milk, as well as protein, showed a significant effect for both MET and AE, but with a smaller magnitude compared to the effect of AA: 190 g/d vs. 80 g/d; $P<0.01$ and $P=0.05$. Regarding the milk fatty acid profile, the AE decreased the proportion of C16:0 and increased the proportion of C18:1 c11, C18:3 n3 and C17:0. The MET also reduced the proportion of C16:0, but significantly increased the proportion of several mono- and polyunsaturated (C18:1 c9; C18:1 c11; C18:1 c13).

3.1 INTRODUÇÃO

Mudanças emergentes nas últimas décadas em alguns importantes mercados de produção de leite do Brasil, com remunerações por percentual de sólidos cada vez mais impactantes na rentabilidade de fazendas leiteiras, têm impulsionado maior preocupação por parte dos nutricionistas com o balanceamento de aminoácidos (AA). Não tão somente a produção de proteína, mas também a produção de gordura do leite, são determinadas pela disponibilidade de substrato (AA por exemplo) e pelo potencial catalítico enzimático da glândula mamária, sendo o aporte de AA considerado um dos principais reguladores deste processo de síntese (YODER et al., 2020).

Dentre os AA mais comumente identificados como deficientes em dietas a base de milho e soja, destaca-se a Met por sua consistente resposta em proteína do leite quando suplementada (LEAN et al., 2018; PATTON, 2010). Mais recentemente detectou-se que tal AA não apenas possui efeito sobre a síntese de proteína, mas também sobre a síntese de gordura na glândula mamária. Além deste efeito ter sido observado em diversos trabalhos (CHIOGNA JUNIOR et al., 2021; CARDOSO et al., 2021; LIANG et al., 2019; TOLEDO et al., 2017), mais recentemente este efeito também foi inserido na equação de predição de produção de gordura do leite no novo NASEM (2021). Qual o real mecanismo com que é modulada esta relação ainda não está bem estabelecido, mas evidências apontam para mecanismos pós absorptivos de regulação transcricional do processo de síntese de gordura no tecido mamário (HAN e ZHANG et al., 2021; LI et al., 2019; LUO et al., 2018; QI et al., 2018). Do ponto de vista econômico do mercado brasileiro de leite, o retorno marginal da suplementação de metionina se torna maior ao contabilizar não apenas aumentos diretos dos teores de proteína, mas também dos teores de gordura do leite, e compreender como manipular dietas para obter tais resultados ao se balancear para AA traz um apelo que vai além do biológico.

A eficiência com que os AA fornecidos pela dieta são utilizados pela vaca para os processos de síntese não são fixos, e podem ser modificados pelo aporte e perfil energético com que este animal está sujeito (LAPIERRE et al., 2020; DANIEL et al., 2016). Estudos manipulando perfil/suprimento de AA e energia simultaneamente, demonstram que fontes glicogênicas de energia são eficientes em modular tanto resposta como eficiência de uso de AA, seja por efeitos do próprio substrato como a glicose, ou efeitos indiretos via aumento de insulina circulante (DANES et al., 2020; NICHOLS et al., 2016; RIUS et al., 2010). Porém estudos utilizando fontes de gordura como aporte energético na interação com aminoácidos ainda são escassos, abrindo espaço para questionar algumas recomendações de relação energia por

proteína (Mcal EM/g PM) sugeridas por modelos nutricionais em avaliações dietéticas, já que esta relação pode se comportar de modo diferente entre as diversas fontes energéticas disponíveis em uma dieta de vacas leiteiras.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, associada ou não a uma fonte adicional de gordura predominantemente saturada, sobre o desempenho produtivo, metabólico e sobre o processo de síntese de gordura do leite em vacas de alta produção no meio da lactação

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob parecer 057/2021.

3.2.1 ANIMAIS UTILIZADOS E INSTALAÇÕES

O experimento foi desenvolvido no rebanho comercial da fazenda ARKAFLA, localizada em Castro, região centro-oriental do Estado do Paraná, Brasil, nos meses de novembro e dezembro de 2019. Para tanto, 112 vacas multíparas da raça Holandês com média de $2,8 \pm 0,7$ lactações, $184,7 \pm 66,8$ dias em lactação, $49,1 \pm 6,7$ kg/d de leite, $4,04 \pm 0,65$ %G e $3,17 \pm 0,22$ %P no início do período experimental foram utilizadas. Os animais permaneceram alojados em estrutura tipo *free-stall*, eram ordenhados três vezes ao dia, às 04:00h, 12:00h e 20:00 horas, em sala de ordenha carrossel com registro automático de produção através do software Dairy Plan[®]. O período experimental total foi de 38 dias, sendo que os três primeiros dias consistiram em coleta de informações para serem utilizadas como covariável.

O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados com um arranjo fatorial de tratamentos 2 x 2, onde as vacas elegíveis a participar do experimento foram separadas em 28 blocos contendo 4 animais cada. A blocagem foi realizada em função da produção de leite média nos 7 dias que antecederam o início do experimento, dias em lactação e ordem de parição. Os 4 animais de cada bloco foram distribuídos aleatoriamente para receber cada um dos 4 tratamentos distintos em um esquema fatorial 2 x 2 (suplementação ou não de Met e suplementação ou não de gordura saturada).

3.2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

Os tratamentos consistiram em fornecimento da dieta convencional da fazenda, formulada para atender em 100% os requerimentos de EM e PM para suporte da produção dos lotes em questão, isolada ou com a adição de uma fonte de gordura hidrogenada (86,9% C18:0 e 9,68% C16:0) (Prius NatDry[®], Auster), juntamente com a suplementação ou não de Met protegida ruminamente (Smartamine M[®], Adisseo). Os teores de Met utilizados foram embasados nos conceitos até então sugeridos para o modelo AMTS (NRC, 2001; SCHWAB et al., 2009; WHITEHOUSE et al., 2009) de 2,4% de Met como proporção da PM. O adensamento com uma fonte de gordura hidrogenada foi formulado para atingir a relação de Met:EM (g:Mcal) de 1,1:1 (HIGGS e VAN AMBURGH, 2016). O suplemento lipídico escolhido se deu devido ao seu alto grau de saturação, e assim, menor risco de possíveis influências de formação de ácidos graxos de perfil trans no rúmen, que poderiam modular a resposta da síntese de gordura do leite (BAUMAN et al., 2006). O perfil de nutrientes das fontes de AA e gordura foram disponibilizados pelos fornecedores dos produtos. Assim, os 4 tratamentos foram:

- a) Controle, sem suplementação de gordura ou Met (CONT);
- b) Alta energia, com suplementação de gordura hidrogenada, porém sem Met (AE);
- c) Controle, com suplementação de Met (MET);
- d) Alta energia, com suplementação de gordura hidrogenada e com suplementação de Met (METAE).

A composição das dietas e seus teores nutricionais, ajustados de acordo com as análises bromatológicas obtidas, são apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

A dieta foi fornecida na forma de dieta total misturada (TMR), uma vez ao dia, às 05:00h da manhã, em quantidade suficiente para se obter cerca de 5% de sobras minutos antes do trato do dia seguinte. O tratamento de AE, que recebeu o adensamento da dieta com gordura hidrogenada, foi fornecido incorporando a gordura à TMR através de vagão misturador, sendo então alimentado aos grupos AE e METAE. Para os tratamentos MET e METAE, 24 g de metionina protegida foram fornecidos na forma de *top dress*, juntamente com milho grão moído, perfazendo o total de 100 g de suplemento/cabeça/dia (MET + fubá de milho). Para os grupos que não receberam Met, o milho também foi fornecido na forma de placebo. A suplementação com Met foi realizada individualmente, quando contidas no canzil, em 2 períodos distintos do dia, após as ordenhas das 05:00h e das 12:00h. O consumo do AA foi monitorado de modo visual, para garantir o consumo de todo o tratamento.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO (EM PORCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) DAS DIETAS COM OU SEM ADIÇÃO DE GORDURA HIDROGENADA, E COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL

Ingredientes (% MS)	CON	MET	AE	METAE
Silagem Pré Secada de Azevém	13,05	13,04	12,89	12,88
Silagem de Milho	30,76	30,73	30,38	30,36
Silagem de Aveia	2,49	2,48	2,46	2,45
Caroço de Algodão	5,14	5,14	5,08	5,08
Milho Grão Úmido Ensilado	10,18	10,17	10,05	10,05
Fubá de Milho	10,12	10,11	9,99	9,98
Casca de Soja	7,92	7,91	7,82	7,81
Farelo de Soja	13,00	12,99	12,84	12,83
Soy Pass	1,96	1,96	1,94	1,93
Resíduo Cervejaria	3,26	3,26	3,22	3,22
Núcleo Mineral e Vitamínico ¹	2,14	2,14	2,11	2,11
Prius NatDry ^{®2}	0	0	1,22	1,22
Smartamine M [®]	0	0,07	0	0,07

¹Núcleo Mineral e Vitamínico: Mg 35 g/kg, Na 85 g/kg, Cl 80 g/kg, Ca 190 g/kg, P 24 g/kg, S 4.000 mg/kg, K 9.900 mg/kg, Cu 450 mg/kg, Zn 2.300 mg/kg, Fe 2.000 mg/kg, Mn 1.800 mg/kg, I 25 mg/kg, Co 30 mg/kg, Se 15 mg/kg, F 300 mg/kg, VitA 156.000UI/kg, VitD 51.500UI/kg, VitE 1.000UI/kg, Biotin 35 mg/kg, Cr 20 mg/kg, Monensin 510 mg/kg, Saccharomyces cerevisiae 1,40x10⁵ UFC/kg.

²Prius NatDry: Gordura Hidrogenada (86.9% C18:0; 9.68% C16:0).

TABELA 3 - NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS, ESTIMADAS COM BASE NO MODELO AMTS

Composição Nutricional	CON	MET	AE	METAE
Proteína Bruta, %MS	16,49	16,53	16,28	16,33
Proteína degradável no rumen, %MS	9,37	9,37	9,25	9,25
Fibra em detergente neutro %MS	31,93	31,91	31,53	31,51
FDNfor, %MS ¹	18,75	18,73	18,51	18,49
Fibra em detergente ácido, %MS	19,11	19,10	18,87	18,86
Amido, %MS	25,68	25,67	25,36	25,34
Extrato Etéreo, %MS	4,14	4,16	5,36	5,37
Cálcio, %MS	0,60	0,60	0,59	0,59
Fósforo, %MS	0,36	0,36	0,35	0,35

Suprimento estimado PM, g/d	3.387,7	3.400,9	3.338,4	3.351,7
Balanço estimado PM, g	-68,40	-33,10	-82,60	-84,00
Lisina, %PM	6,45	6,42	6,45	6,42
Metionina, %PM	2,04	2,42	2,04	2,42
Lisina:Metionina	3,16	2,66	3,16	2,65
Met:EM ²	0,87	1,1	0,84	1,09

¹Fibra em detergente neutro oriunda de foragem. ²Relação metionina e energia metabolizável.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DOS ALIMENTOS VOLUMOSOS UTILIZADOS NAS DIETAS EXPERIMENTAIS

Nutriente	Silagem de Milho	Pré Secado de Azevém	Silagem de Aveia
Matéria Seca	32,67	46,36	29,2
Proteína Bruta, %MS	7,30	14,89	13,35
Fibra em detergente neutro, %MS	36,98	50,24	49,33
Fibra em detergente ácido, %MS	19,20	28,78	32,63
Extrato Etéreo, %MS	3,38	3,19	2,81
Matéria Mineral, %MS	2,88	10,73	9,50
Lignina, %MS	2,53	4,00	3,21
Cálcio, %MS	0,20	0,93	0,33
Fósforo, %MS	0,17	0,22	0,30

As amostras dos alimentos foram coletadas semanalmente, secas em estufa de circulação forçada a 55°C e moídas a 1 mm em moinho tipo "Willey", onde sequencialmente determinou-se o teor de matéria seca (MS) total em estufa a 105°C por 16 horas (Silva e Queiroz, 2009), proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldahl e matéria mineral (MM) por incineração a 550°C, por 4 horas. Foram determinados ainda os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), conforme Van Soest et al. (1991), utilizando-se α -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozymes Latin América Ltda.), e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), segundo GOERING e VAN SOEST (1970). Já a análise de extrato etéreo (EE) seguiu as recomendações de Silva e Queiroz (2009). As análises foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal da UFPR, em Curitiba, Paraná. Os resultados médios das análises de volumosos encontram-se na Tabela 4.

3.2.3 DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO DO LEITE E METABÓLITOS

A produção de leite foi mensurada individualmente durante todo o período experimental, pela identificação, leitura e registro automático dos animais no sistema da sala de ordenha. As amostras para análise de composição do leite foram coletadas individualmente e separadamente durante as primeiras nove ordenhas, que foram posteriormente utilizadas como covariável. Ao longo do período de suplementação, amostras de leite foram coletadas durante três ordenhas consecutivas semanalmente; e por mais nove ordenhas nos 3 últimos dias do período experimental, com auxílio de amostradores automáticos de leite, disponíveis no próprio equipamento de ordenha. No penúltimo dia do período experimental, uma amostra de aproximadamente 500 ml de leite foi coletada de cada animal e imediatamente congelada para posterior análise do perfil de ácidos graxos.

Amostras de leite foram enviadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Associação Paranaense dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, para análise dos teores de gordura, proteína, lactose e nitrogênio ureico no leite (NUL) (BENTLEY, 2007). Posteriormente foram calculadas as produções, em kg/vaca/dia, de cada componente do leite, além das produções de leite corrigidas para energia e a energia excretada no leite em Mcal/vaca/dia (BOERMANN et al., 2015). Quanto à excreção de N, foi expressa também em g/kg de proteína no leite (NULP/PP) (WATTIAUX e CRUMP, 2014).

Para análise do perfil de AG, as amostras de leite foram congeladas sem qualquer conservante químico, e posteriormente analisadas por cromatografia gasosa (Finnigan Focus CG, Thermo Fisher Scientific™). A gordura do leite foi extraída utilizando o procedimento descrito por Hara e Randin (1978). Após a extração da gordura, as amostras foram metiladas (CHRISTIE, 1982) e 1 µL de extrato esterificado foi injetado em uma coluna capilar, com 0,25 µm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura do filme. A identificação dos AG foi feita por comparação do tempo de retenção e para determinar a porcentagem de cada FA foi utilizado o software Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Itália). A comparação foi feita usando o perfil de ácidos graxos da manteiga. Os ácidos graxos foram expressos e analisados individualmente ou agrupados de acordo com o número de saturações, em ácidos graxos saturados (sem insaturação) – AGS; ácidos graxos monoinsaturados (com uma insaturação) – AGMI; ou ácidos graxos poli-insaturados (com duas ou mais insaturações) – AGPI. Os ácidos graxos também foram agrupados de acordo com sua origem, compreendendo AG de cadeia curta (C4 a C14) – *De Novo*; AG de cadeia média (C15 e C16) - Mistos; e ácidos graxos de cadeia longa (C17 ou mais) – Pré-formados.

Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais, no último dia do período experimental, realizada cerca de 10 horas após o fornecimento da dieta do período da manhã. As amostras foram colhidas em tubos vacuolizados (Vacutainer®) sem anticoagulante (10 mL) e com anticoagulante EDTA (6 mL), e mantidas sob refrigeração até o processamento. Logo após a colheita, as amostras foram centrifugadas (10 min a 3000 rpm) para obtenção do soro e do plasma que foram armazenados em microtubos de plástico tipo eppendorf® de 2 mL (em duplicata) e congelados a -20°C (STOKOL e NYDAM, 2005). A partir do soro, foram determinadas as concentrações de AGNE (ácidos graxos não esterificados), quantificadas por metodologia enzimática colorimétrica, usando reagentes padronizados comerciais da marca Randox® (kit NEFA FA115). Também foram analisados os metabólitos colesterol total, albumina, globulina, proteínas totais, glicose e ureia. Estimativas das concentrações de VLDL foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Ospina et al. (2010). As análises foram realizadas em analisador bioquímico automático do modelo BS-200 da marca Mindray. Amostras hemolisadas foram descartadas (STOKOL e NYDAM, 2005).

No último dia do período experimental, foram estimados o peso vivo, com uso de fita métrica para aferição do perímetro torácico e a avaliação do escore de condição corporal (ECC) dos animais, por dois avaliadores independentes devidamente treinados. O ECC foi avaliado de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda (WILDMAN et al., 1982), com frações de 0,25. Os valores finais foram obtidos através da média das avaliações dos dois avaliadores.

3.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro Wilk, homogeneidade das variâncias através do teste de Levene e retirada dos outliers com base no valor do *r* de Student. Os dados de produção e composição do leite foram analisados como medidas repetidas no tempo, usando o procedimento MIXED do SAS (2002) para testar as diferenças nas médias de tratamento. Mudanças ao longo do tempo são esperadas nessas variáveis dependentes, assim, um modelo com análise de medidas repetidas foi considerado adequado. Os dados de perfil de ácidos graxos, peso, ECC e os metabólitos sanguíneos foram analisados usando o procedimento MIXED sem o efeito de tempo, uma vez que foram coletadas apenas no período final do experimento.

A suplementação de MET, de energia (EN) e a interação entre MET e EN (MET*EN) foram avaliadas como efeitos fixos no modelo. Dentre as variáveis, as mesmas coletadas

durante o período pré-experimental foram incluídas como covariável no modelo. O modelo também incluiu vacas aninhadas dentro do bloco como efeito aleatório. As estruturas de covariância testadas foram autorregressivas de primeira ordem (AR-1), não estruturada (UN), simétrica-composta (CS) e toeplitz (TOEP), e a estrutura de covariância escolhida foi definida de acordo com o menor valor obtido para “Akaike’s Information Criterion Corrected” (AICC), sendo assim utilizada a AR-1 para todas as variáveis dependentes.

Para todas as variáveis respostas as médias foram obtidas através do comando LSMEANS. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey quando houve significância na análise de variância. Durante a interpretação e discussão dos resultados fora adotado como efeito significativo quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P < 0,10$.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 PRODUÇÃO DE LEITE

Médias ajustadas de produção de leite, produção de leite corrigida para energia e excreção diária de energia no leite estão demonstradas na Tabela 5. O aumento da densidade energética com uma fonte lipídica altamente saturada aumentou a produção de leite (1,5 kg/d; $P=0,02$), a produção de leite corrigida para energia (2,0 kg/d; $P<0,01$) e a excreção de energia diária no leite (1,5 Mcal/d; $P<0,01$). Já a suplementação de metionina protegida da degradação ruminal aumentou a produção de leite corrigida para energia (0,75 kg/d; $P=0,01$) e a excreção de energia diária no leite (1,46 Mcal/d; $P<0,01$), porém nenhuma interação foi observada entre MET e AE.

Um dos objetivos centrais do presente estudo foi avaliar os efeitos em desempenho da suplementação de Met quando um aporte maior de energia era fornecido. As respostas em excreção de energia ocorreram de foram independentes e aditivas. Respostas ao aumento de energia oriundo de uma suplementação de fontes diversas de gordura são bem estabelecidas e replicadas por diversas revisões (NETO et al., 2021; HU et al., 2017; RABBIE et al., 2012), com incrementos similares de produção de leite e leite corrigido para energia, variando entre 1,0 e 1,6 kg/d, com adições de fontes de gordura médias de 2% da MS. Respostas em produção de leite sobre o maior aporte de metionina porém, são inconsistentes, uma vez que trabalhos realizados com animais durante o período de transição demonstram maiores efeitos (POTTS et al., 2020; ZHOU et al., 2016; OSORIO et al., 2013), enquanto que em outros estudos com estágios de lactação mais avançados, pouco ou nenhum efeito foi observado (LEAN et al., 2018; PATTON, 2010).

Interações entre energia e aminoácidos (ou minimamente proteína verdadeira) vem sendo investigadas por estudos utilizando como fontes de energia amido, propionato ou glicose propriamente dita (DANES et al., 2020; LAPIERRE et al., 2020; CURTIS, 2018; RIUS et al., 2010; RAGGIO et al., 2006). Com mais limitada literatura, também foi investigada a suplementação de gorduras (NICHOLS et al., 2018), porém encontrando relações muito similares às encontradas em nosso experimento para produção de leite e excreção de energia, observando apenas efeitos independentes e aditivos para energia e AA.

3.3.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE

Médias ajustadas de composição e produção diária de sólidos também estão demonstrados na Tabela 5. Concentração de proteína do leite foi afetada pela suplementação de MET, porém não pela AE, apresentando uma tendência de interação entre os efeitos ($P=0,09$). Já a produção diária de proteína teve resposta para ambos os efeitos ($P<0,01$), sendo que as suplementações de MET e AE aumentaram 80 e 70 g/d de proteína, respectivamente.

Concentração de gordura do leite interessantemente foi aumentada apenas por MET (0,26 pontos percentuais; $P<0,01$). Já a produção diária de gordura, assim como proteína, apresentou efeito significativo tanto para MET como AE, porém com menor magnitude comparativamente ao efeito do AA (190 g/d vs. 80g/d; $P<0,01$ e $P=0,05$, respectivamente), sendo que possivelmente nos tratamentos AE tal resposta foi direcionada pelo efeito em produção total de leite fluido já discutido anteriormente.

O aumento de energia da dieta teve efeito sobre concentração e produção de lactose (80 g/d; $P<0,01$), sendo que o efeito de MET não apresentou nenhuma significância, com tendência de interação entre os tratamentos. Tanto NUL como a excreção de N/kg de proteína do leite foram afetadas pela concentração energética da dieta, sendo que a suplementação com gordura aumentou ($P<0,01$) a perda de N em 0,35 g para cada kg de proteína excretada. A suplementação de MET não alterou NUL, porém devido ao aumento de produção de proteína, reduziu a perda de N em relação do total produzido, na magnitude de 0,18 g/kg de proteína. Peso corporal e ECC não foram ($P>0,05$) afetados pelos tratamentos.

TABELA 5 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AE OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS EM DADOS DE DESEMPENHO PRODUTIVO

Item	Tratamentos				Efeito (P-Valor)			
	CON	MET	AE	MET AE	EPM	MET	EN	MET*E N
Produção de Leite, kg/d	48,54	47,71	49,97	49,73	0,24	0,71	0,02	0,61
ução de Leite corrigido para energia, kg/d	50,12	51,96	52,77	53,56	0,28	0,01	<0,01	0,76
Excreção de energia no leite, Mcal/d	34,10	35,55	36,15	36,76	0,20	<0,01	<0,01	0,72
Proteína, %	3,11	3,30	3,18	3,33	0,01	<0,001	0,13	0,09
Proteína, kg/d	1,50	1,57	1,58	1,65	0,01	<0,001	<0,001	0,40
Gordura, %	3,83	4,15	3,97	4,06	0,03	<0,001	0,74	0,27
Gordura, kg/d	1,85	1,97	1,98	2,01	0,02	<0,01	0,05	0,39
Lactose %	4,63	4,61	4,66	4,66	0,01	0,22	0,05	0,08
Lactose, kg/d	2,25	2,20	2,32	2,32	0,01	0,65	<0,01	0,39
Nitrogênio ureico no leite, mg/dL ¹	13,09	12,76	13,94	14,00	0,09	0,54	<0,001	0,52
NULPPP, g/kg ²	4,24	3,88	4,39	4,23	0,03	<0,01	<0,001	0,43
Peso Vivo, kg/vaca	726,5	718,3	729,4	721,2	5,81	0,22	0,32	0,45
Score de condição corporal	3,15	3,18	3,12	3,10	0,05	0,65	0,43	0,57

¹NUL. ²Gramas de N excretado por kg de proteína total produzida no leite.

Os efeitos da suplementação de metionina protegida sobre a produção de proteína foram repetidamente observados em diversos trabalhos (CHIOGNA JUNIOR et al., 2021; POTTS et al., 2020; TOLEDO et al., 2017), e seus mecanismos de resposta são cada vez mais bem compreendidos. Estes mecanismos são devido a sua participação estrutural na caseína do leite, que em muitas dietas caracteriza uma deficiência deste AA perante a sua exigência (SCHWAB e BRODERICK, 2017), como também por seus efeitos de regulação e ativação da síntese proteica via complexo mTOR e seus intermediários na iniciação e alongamento da transcrição de proteínas (OSORIO et al., 2016; ARRIOLA APELO et al., 2014). Os mecanismos acima citados podem elucidar também os achados do presente estudo.

De modo similar, o efeito estimulatório da energia sobre a produção de proteína do leite também vem sendo demonstrado e discutido, principalmente com o uso de substratos glicogênicos ou de glicose (DANES et al., 2020; LAPIERRE et al., 2020; RIUS et al., 2010). Identificar o real mecanismo com que o aumento de aporte de energia glicogênica modula a produção de proteína é complexo, uma vez que quando modelados via dieta, o aumento de carboidratos de rápida fermentação pode desencadear uma maior produção de PMic, e consequentemente um maior fluxo de AAs para o intestino (BRODERICK et al., 2003). Do mesmo modo, aumentos de fluxo sanguíneo para a glândula mamária também já foram observados frente a maiores aportes de fontes precursoras de glicose (RIUS et al., 2010; RAGGIO et al., 2006). Existem efeitos estimulatórios do aumento das concentrações de insulina circulante sobre o complexo mTORC1 e sobre a síntese de caseína (APPUHAMY et al., 2011), além de possíveis aumentos da eficiência de uso dos AA pela maior captação pelo tecido mamário, devido a maior demanda para o leite (DANES et al., 2020).

Por outro lado, estudos com o uso de gordura na manipulação do aporte energético e sua relação com o uso de AA são escassos. Uma das raras exceções é o estudo de Nichols et al. (2018). Observando a relação entre dietas variando a concentração de proteína via PNDR ou energia via gordura saturada, vemos resultados similares aos encontrados em nosso estudo, com aumentos significativos em produção de proteína, porém sem alteração de sua concentração nas dietas de AE, diferentemente das dietas de alta proteína, onde o aumento da produção de proteína diária se deu devido também a maior concentração deste componente no leite. Aliada a estas observações, houve aumento da eficiência do uso do N nas dietas de alta energia. Assim, possivelmente, a fonte lipídica alterou o metabolismo proteico por propiciar um maior dreno de aminoácidos, bem como um aumento da eficiência dos mesmos para atender maior produção de leite, uma vez que o aumento de produção de leite é consistente não apenas em nossos achados, mas em diversas meta-análises (NETO et al., 2021; RABBIE et al., 2012). Ainda segundo os dados de Nichols et al. (2018), houve também aumento da eficiência de uso da

proteína ingerida. Este aumento da taxa de remoção de AA pela glândula mamária foi observado também em estudo de Cant et al. (1993) ao infundir gordura no abomaso, associada a caseína. Devido à ausência de dados de consumo de MS em nosso estudo, tal evidência não pode ser corroborada no que se refere a eficiência. Mais estudos de caráter metabólico são necessários para compreender os reais mecanismos envolvidos nesta resposta, observando efeitos em fluxo sanguíneo para o tecido mamário e talvez possíveis respostas hormonais frente ao tratamento.

Um dos principais objetivos específicos do presente experimento foi identificar possíveis efeitos da suplementação de MET sobre a gordura do leite, e respostas bastante enfáticas foram identificadas. Dados similares, porém, pouco explorados, têm sido encontrados em outros ensaios (CHIOGNA JUNIOR et al., 2021., POTTS et al., 2020; FAGUNDES et al., 2018; TOLEDO et al., 2017), e também sugeridos segundo abordagens meta-analíticas (DALEY et al., 2019). Considerando que nos experimentos que observaram tais resultados assim como no presente estudo, a fonte de metionina utilizada foi protegida ruminalmente, sugere-se que nestes cenários o efeito seja pós absorptivo. Estudos com cultivo celular de tecido mamário de bovinos têm sugerido que a mediação da síntese de gordura do leite via MET se deva através do estímulo no complexo mTORC1 (HAN et al., 2021), seja ele via co-ativadores de transcrição regulada por CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP) (LI et al., 2019), regulando a atividade do SREBP-1 pelo controle da entrada nuclear de Lipin1 via fosforilação (OSORIO et al., 2016), ou na expressão de mRNA de glycyl-tRNA synthetase (GlyRS), um mediador chave na sinalização de aminoácidos para a ativação da via mTOR (LUO et al., 2018).

Pouco se relata em estudos usando fontes altamente saturadas de gordura na dieta de vacas em lactação como substrato energético sobre a eficiência de uso do N, sendo que em diversos estudos meta analíticos tão pouco são demonstrados tais resultados. No trabalho de Nichols et al. (2018), as dietas com alta gordura não alteraram NUL, porém aumentaram a eficiência do uso do N, diferentemente dos resultados encontrados em nosso trabalho onde a perda de N no leite foi maior em dietas com AE. No estudo de Cant et al. (1993), a eficiência de uso do N não foi relatada, porém a remoção de AA do plasma foi aumentada em dietas de alta gordura infundida, contrariamente à ureia plasmática que foi elevada nos tratamentos de alta gordura, corroborando com a maior proporção de N não proteico no leite, comportamentos muito similares aos do estudo realizado por Casper e Schingoethe (1989). Nestes cenários, onde a produção de lactose também é aumentada, um incremento no uso e catabolismo de AA no fígado para gliconeogênese pode ser considerado, uma vez que a demanda por glicose para síntese de lactose possivelmente foi aumentada, mesmo tendo evidências de que o fornecimento

de AG na dieta podem poupar glicose e dar suporte para este aumento de síntese de lactose (CANT et al., 1993).

3.3.3 PERFIL DE ACIDOS GRAXOS DA GORDURA DO LEITE

Dados de caracterização do perfil da gordura do leite estão demonstrados na Tabela 6. O aumento da concentração energética das dietas com inclusão de 1,2% da MS de gordura saturada, marcadamente reduziu a proporção de C16:0, e aumentou as concentrações de C18:1 c11, C18:3 n3 e C17:0. A suplementação com metionina também reduziu a proporção de C16:0, porém aumentou significativamente a proporção de diversos AG mono e poli-insaturados (C18:1 c9, C18:1 c11 e C18:1 c13), além de uma tendência ($P=0,09$) de aumento da participação de AGs pré formados na composição da gordura do leite. Curiosamente, houve uma tendência de aumento na relação C14:1/C14:0 com o uso de MET, um importante indicador de atividade da enzima estearoil-CoA dessaturase-1 (SCD1) no tecido mamário. Apenas uma tendência de interação entre MET e EN foi observada, com aumentos ($P=0,10$) nas proporções de AG *De Novo* e de ômega 3 (C18:3 n3).

Já está bem estabelecido que o perfil da gordura do leite pode ser modificado por fatores dietéticos (WOOLPERT et al., 2016), incluindo perfil fermentativo de carboidratos, características da fibra e perfil de gordura da dieta (BIONAZ et al., 2020). O aumento do conteúdo de gordura da dieta, principalmente com altas concentrações de C18:0, tendem a reduzir a síntese *De Novo* de AG na glândula mamária, assim como a própria concentração de C16:0 (PALMQUIST e JENKINS, 2017), uma vez que parte dos AGs dietéticos podem ser incorporados diretamente na gordura do leite. Tal evento foi parcialmente observado em nosso estudo com aumento de alguns AGs de cadeia longa, e redução de C16:0 nas dietas de AE, porém com menor magnitude quando comparado a outros ensaios (STOFFEL e ARMENTANO, 2015).

As alterações do perfil de gordura com a suplementação de MET foram expressivas, principalmente com aumentos da participação de AG mono e poli-insaturados. Poucos experimentos suplementando AA trazem ou discutem dados de perfil de AG do leite. Giallongo et al. (2015) estudando o efeito de diversos AA em dietas deficientes em PM encontraram com suplementação de MET apenas uma tendência de redução de C18:2 c9c12, similarmente a observação do nosso estudo. Lapierre et al. (2020), testando a interação AA e energia, encontraram efeito para aumento da proporção de AG pré-formados em dietas suplementadas com Lys e Met, porém utilizando amido como fonte energética adicional.

SCD1 é uma enzima limitante da taxa de biossíntese de AG mono e poli-insaturados de cadeia longa (por exemplo C18:1), necessários na primeira etapa da síntese de triglicerídeos (PATON e NTAMBI, 2009). Mele et al. (2007) estudando diferentes genótipos para expressão de SCD1 em vacas holandesas, encontraram diferenças significativas nas concentrações de AG monoinsaturados para animais com depuração de genes ligados a expressão desta enzima. Além disso, encontraram uma importante correlação entre C14:1/C14:0 e a expressão desta enzima, sugerindo tal razão como indicador da atividade de SCD1, já que tais AG são exclusivamente sintetizados na glândula mamária (SALTER et al., 2006). Como discutido anteriormente, MET exerce efeito de ativação em mTORC1, que por sua vez pode modular a expressão de enzimas ligadas a síntese de lipídeos via SREBP-1, entre elas SCD1 (LAPLANTE e SABATINI, 2009). Estudos conduzidos em ratos (FORNEY et al., 2018) demonstram claramente o efeito de redução da expressão de SCD1 em dietas com restrição da ingestão de MET.

Diante de tais evidências, juntamente a maiores produções de gordura do leite, do aumento significativo da participação de AGs mono e poli-insaturados, e da tendência da maior razão C14:1/C14 frente a suplementação de metionina, nos indicam que existe algum grau de regulação deste AA sobre a expressão de genes ligados a síntese lipídica em vacas leiteiras.

TABELA 6 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AE OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS SOBRE O PERFIL DA GORDURA DO LEITE

g/100g AG	—	Tratamentos				Efeito (<i>P</i> -Valor)			
		CON	MET	AE	AEMET	EPM	MET	EN	EN*MET
C4:0		2,76	2,67	2,68	2,58	0,03	0,1	0,17	0,87
C6:0		2,03	1,99	1,92	1,95	0,03	0,96	0,19	0,6
C8:0		1,41	1,39	1,41	1,38	0,14	0,39	0,96	0,79
C10:0		3,75	3,65	3,73	3,77	0,04	<0,01	<0,01	0,96
C10:1		0,33	0,32	0,32	0,33	0,01	0,73	0,95	0,66
C11:0		0,14	0,13	0,13	0,14	0,01	0,61	0,49	0,41
C12:0		4,46	4,34	4,31	4,48	0,05	0,84	0,99	0,18
C12:1		0,1	0,09	0,09	0,09	0,01	0,86	0,64	0,38
C13:0		0,19	0,17	0,19	0,19	0,01	0,57	0,41	0,4
C13:0 iso		0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,4	0,25	0,95
C13:0 anteiso		0,12	0,12	0,11	0,13	0,01	0,14	0,52	0,17
C14:0		12,6	12,36	12,63	12,86	0,09	0,98	0,13	0,19
C14:0 iso		0,06	0,06	0,06	0,06	0,01	0,93	0,37	0,7
C14:1/C14:0		0,08	0,09	0,08	0,09	0,00	0,07	0,95	0,98
C14:1c9		1,04	1,05	1,01	1,11	0,02	0,24	0,7	0,38
C15:0		1,29	1,2	1,32	1,33	0,03	0,55	0,3	0,48
C15:0 iso		0,17	0,18	0,18	0,18	0,01	0,21	0,67	0,98

C15:0 anteiso	0,41	0,43	0,42	0,42	0,01	0,27	0,87	0,55
C16:0	32,39	31,89	32,19	31,58	0,22	<0,01	0,99	0,99
C16:1c9	1,61	1,53	1,62	1,61	0,04	0,5	0,5	0,59
C16:0 iso	0,17	0,16	0,15	0,15	0,01	0,66	0,06	0,55
C17:0	0,54	0,54	0,58	0,57	0,01	0,97	0,05	0,84
C17:0 iso	0,26	0,28	0,27	0,28	0,01	0,03	0,66	0,47
C17:1	0,13	0,12	0,13	0,13	0,01	0,99	0,57	0,37
C18:0	9,18	9,58	9,4	9,3	0,16	0,65	0,92	0,45
C18:1 c9	17,08	17,71	17,17	17,71	0,18	0,12	0,90	0,91
C18:1 c11	1,09	1,14	1,14	1,24	0,02	0,03	0,03	0,57
C18:1 c12	0,6	0,64	0,62	0,62	0,01	0,33	0,98	0,42
C18:1 c13	0,08	0,09	0,08	0,1	0,00	0,02	0,59	0,98
C18:1 trans	1,77	1,89	1,77	1,85	0,04	0,26	0,83	0,8
C18:1 c15	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,28	0,76	0,26
C18:1 tl6	0,26	0,28	0,26	0,27	0,01	0,15	0,67	0,59
C18:2 c9tl1	0,22	0,25	0,23	0,24	0,01	0,12	0,96	0,34
C18:2 c9c12	2,53	2,23	2,63	2,11	0,04	<0,01	0,92	0,11
C18:3 n6	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,87	0,87	0,64
C18:3 n3	0,33	0,31	0,32	0,34	0,01	0,47	0,04	0,03
C20:0	0,08	0,08	0,08	0,07	0,01	0,67	0,2	0,4
C20:1	0,06	0,07	0,06	0,07	0,01	0,03	0,28	0,53

C20:3 n3	0,005	0,006	0,005	0,005	0,01	0,55	0,48	0,37
C20:4 n6	0,13	12,0	0,13	0,13	0,01	0,09	0,48	0,37
C20:5 n3	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,05	0,3	0,1
C22:0	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,04	<0,01	0,82
C 22:1n9	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,13	0,81	0,13
C22:5	0,04	0,03	0,03	0,03	0,01	0,22	0,81	0,11
C23:0	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,14	0,35	0,87
C24:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,75	0,39	0,13
C24:1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,24	0,36
Denovo	30,87	30,18	30,57	31,02	0,18	0,74	0,45	0,10
Mix	34,09	34,52	34,93	34,32	0,24	0,22	0,71	0,97
Pré-formado	33,38	34,85	33,78	34,35	0,31	0,09	0,94	0,47
Saturado	72,07	71,3	71,85	71,48	0,25	0,25	0,96	0,69
Insaturado	27,3	27,93	27,53	27,89	0,25	0,32	0,85	0,79
Mono insaturado	24,22	25,16	24,36	25,21	0,23	0,05	0,83	0,92
Poli-insaturado	3,39	3,1	3,49	3,01	0,05	<0,01	0,92	0,28

3.3.4 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

Médias ajustadas para metabólitos sanguíneos estão resumidos na Tabela 7. Dietas com maior concentração de gordura aumentaram ($P<0,01$) ureia no sangue, em concordância com o aumento de NUL. Redução das concentrações séricas de glicose e VLDL também foram observadas ($P<0,01$) para os tratamentos de alta energia. Dietas suplementadas com MET não tiveram efeito ($P>0,05$) sobre parâmetros sanguíneos. O mesmo comportamento de NUL foi observado em ureia sérica, uma vez que ambos são altamente correlacionados (BRODERICK e CLAYTON, 1997); tais resultados não são inesperados. Ao infundir caseína e gordura no abomaso, Cant et al. (1993) observaram comportamento similar ao encontrado em nosso trabalho, uma vez que os tratamentos de alta gordura estimularam a produção de leite, tornaram o balanço de glicose negativo no metabolismo, sugerindo possíveis aumentos de ureia no sangue por uso parcial de AAs no fígado como substratos para gliconeogênese. Reduções nas concentrações de glicose em nosso estudo concomitantemente com aumentos de ureia sérica podem indicar efeito similar a respeito do balanço energético.

3.4 CONCLUSÃO

Os dados observados em nosso trabalho suportam claramente três teorias. Primeiro, a suplementação de Met possui efeito não apenas sobre a composição proteica do leite, mas também a fração lipídica. Segundo, alterações no perfil de AG nos grupos suplementados com Met indicam que estas são explicadas por mecanismos pós absorptivos e de caráter regulatório da atividade e expressão de enzimas ligadas ao metabolismo lipídico na glândula mamária. Por último, os resultados aqui relatados também demonstram que as respostas entre fluxo de AA e energia não são interativas, mas sim aditivas, embora a eficiência de uso da proteína ingerida possa sim sofrer interação entre ambos. Assim nos parece que utilizar relações entre AA e a concentração energética da dieta como alvo de balanceamento nutricional de vacas lactantes se torna minimamente questionável.

TABELA 7 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AE OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS EM METABÓLITOS SANGÜÍNEOS

	Tratamentos					Efeito (<i>P</i> -Valor)	
	CON	MET	AE	AEMET	EPM	MET	AE
Ureia, mg/dL	28,93	30,62	33,19	32,40	0,46	0,61	<0,01
Colesterol Total, mg/dL	220,16	216,9	205,17	207,06	3,95	0,93	0,12
Glicose, mg/dL	66,35	67,99	65,29	64,13	0,48	0,78	<0,01
Proteína Total, mg/dL	7,33	7,31	7,18	7,51	0,05	0,16	0,82
Albumina, mg/dL	3,63	3,63	3,58	3,58	0,03	0,27	0,22
Globulina, mg/dL	3,70	3,70	3,60	4,02	0,06	0,09	0,32
AGNE, mg/dL ¹	1,54	1,26	1,37	1,31	0,06	0,20	0,65
VLDL, mg/dL ²	1,65	1,78	1,40	1,44	0,05	0,33	<0,01

¹Ácido graxo não esterificado. ²Lipoproteína de densidade muito baixa.

3.5 REFERÊNCIAS

APELO, S. A.; KNAPP, J. R.; HANIGAN, M. D. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 7, p. 4000-4017, 2014.

APPUHAMY, J. A. D. R. N. et al. Effects of jugular-infused lysine, methionine, and branched-chain amino acids on milk protein synthesis in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 1952-1960, 2011.

BAUMAN, D. E. et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 1235-1243, 2006.

BENTLEY INSTRUMENTS, INC. *Bentley Sistema Combinado 2300. Operator's manual*. Chaska: Bentley, 2007. 115 p.

BEQUETTE, B. J. et al. Amino acid exchange by the mammary gland of lactating goats when histidine limits milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 765-775, 2000.

BIONAZ, M.; VARGAS-BELLO-PÉREZ, E.; BUSATO, S. Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 11, p. 110, 2020.

BOERMAN, J. P. et al. Effects of partly replacing dietary starch with fiber and fat on milk production and energy partitioning. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 7264-7276, 2015.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1370-1381, 2003.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 2964-2971, 1997.

CANT, J. P.; DEPETERS, E. J.; BALDWIN, R. L. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 762-774, 1993.

CARDOSO, F. et al. Effect of protein level and methionine supplementation on dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5467-5478, 2021.

CASPER, D. P.; SCHINGOETHE, D. I. Model to describe and alleviate milk protein depression in early lactation cows fed a high fat diet. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 3327, 1989.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. *Journal of Lipid Research*, v. 23, p. 1072, 1982.

CURTIS, R. V. et al. Maintenance of plasma branched-chain amino acid concentrations during glucose infusion directs essential amino acids to extra-mammary tissues in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 4542-4553, 2018.

DANES, M. A. C. et al. Post-ruminal supplies of glucose and casein, but not acetate, stimulate milk protein synthesis in dairy cows through differential effects on mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6218-6232, 2020.

DANIEL, J. B. et al. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal*, v. 10, p. 1975-1985, 2016.

DALEY, V. L.; BOMPADRE, T. F. V.; HANIGAN, M. D. Effects of absorbed amino acids on the milk fat yield: A meta-analytic approach. *Journal of Dairy Science*, v. 92, Suppl. 1, p. 103, 2009.

FAGUNDES, M. A. et al. Influence of supplementing a methionine derivative, N-acetyl-l-methionine, in dairy diets on production and ruminal fermentation by lactating cows during early to mid lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 7082-7094, 2018.

FORNEY, L. A. et al. The role of suppression of hepatic SCD1 expression in the metabolic effects of dietary methionine restriction. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, v. 43, p. 123-130, 2018.

GIALLONGO, F. et al. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 3292–3308, 2015.

HAN, M.; ZHANG, M. The regulatory mechanism of amino acids on milk protein and fat synthesis in mammary epithelial cells: a mini review. *Animal Biotechnology*, v. 2, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1080/10495398.2021.1950743.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, v. 90, p. 420-426, 1978.

HIGGS, R. J.; VAN AMBURGH, M. E. Evolution of the CNCPS-Development of V7. In: *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference*, Cornell University, Syracuse, NY, p. 125-146, 2016.

HU, W.; BOERMAN, J. P.; ALDRICH, J. M. Production responses of Holstein dairy cows when fed supplemental fat containing saturated free fatty acids: a meta-analysis. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, v. 30, p. 1105-1116, 2017.

JUNIOR, V. C. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLOS ONE*, v. 16, 2021.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Current Biology*, v. 19, p. R1046-52, 2009.

LAPIERRE, P. A. et al. Impact of starch and energy on amino acid requirements of lactating cows. In: *Cornell Nutrition Conference*, Cornell University, Syracuse, NY, 2020.

LEAN, I. J. et al. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 340-364, 2018.

LI, P. et al. CRTC2 is a key mediator of amino acid-induced milk fat synthesis in mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019.

LIANG, S. L. et al. Effect of N-acetyl-l-methionine supplementation on lactation performance and plasma variables in mid-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 5182-5190, 2019.

LUO, C.; QI, H.; HUANG, X. GlyRS is a new mediator of amino acid-induced milk synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, p. 2973–2983, 2018.

MELE, M. et al. Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 4458-4465, 2007.

NASEM. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press, 2021.

NETO, J. M.; DE SOUZA, J.; LOCK, A. L. Effects of calcium salts of palm fatty acids on nutrient digestibility and production responses of lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 9752-9768, 2021.

NICHOLS, K. et al. Glucose supplementation stimulates peripheral branched-chain amino acid catabolism in lactating dairy cows during essential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 1145–1160, 2016.

NICHOLS, K. et al. Feed and nitrogen efficiency are affected differently but milk lactose production is stimulated equally when isoenergetic protein and fat is supplemented in lactating dairy cow diets. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 7857–7870, 2018.

NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

OSORIO, J. S. et al. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248-6263, 2013.

OSORIO, J. S.; LOHAKARE, J.; BIONAZ, M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics*, v. 48, n. 4, p. 231-256, 2016.

OSPINA, P. A. et al. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 1596-1603, 2010.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10061-10077, 2017.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 297, p. 28-37, 2009.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2105-2118, 2010.

POTTS, S. B. et al. Production responses to rumen-protected choline and methionine supplemented during the periparturient period differ for primi- and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6070-6086, 2020.

QI, H. et al. Methionine promotes milk protein and fat synthesis and cell proliferation via the SNAT2-PI3K signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 11027-11033, 2018.

RABIEE, A. R. et al. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: a meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3225-3247, 2012.

RAGGIO, G. et al. Effect of casein and propionate supply on mammary protein metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 89, p. 4340–4351, 2006.

RIUS, A. G. et al. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2034–2043, 2010.

SALTER, A. et al. Milk Fatty Acids: Implications for Human Health. *Recent Advances in Animal Nutrition*, p. 1-18, 2006.

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10094-10112, 2017.

SCHWAB, C. G. et al. Reevaluation of the breakpoint estimates for the NRC (2001) required concentrations of lysine and methionine in metabolizable protein for maximal content and yield of milk protein. *Journal of Dairy Science*, v. 92 (Suppl 1), p. 103, 2009.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos - Métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

STOFFEL, C. M.; CRUMP, P. M.; ARMENTANO, L. E. Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 431–442, 2015.

STOKOL, T.; NYDAM, D. V. Effect of anticoagulant and storage conditions on bovine nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in blood. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 3139-3144, 2005.

TOLEDO, M. Z. et al. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. *PLOS ONE*, v. 12, e0189117, 2017.

YODER, P. S. et al. Effects of jugular infused methionine, lysine, and histidine as a group or leucine and isoleucine as a group on production and metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 3, p. 2387-2404, 2020.

WATTIAUX, M. A.; CRUMP, P. M. Exploring milk urea-N excretion as a nutritional and environmental management tool for the dairy industry. *Journal of Animal Science*, v. 92 (E-Suppl. 2), p. 350, 2014.

WILDMAN, E. E. et al. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 495-501, 1982.

WHITEHOUSE, N. et al. Comparison of optimal lysine and methionine concentrations in metabolizable protein estimated by the NRC (2001), CPM-Dairy (v.3.0.10) and AMTS. Cattle (v.2.1.1) models. *Journal of Dairy Science*, v. 92 (Suppl. 1), p. 103, 2009.

WOOLPERT, M. E. et al. Management, nutrition, and lactation performance are related to bulk tank milk de novo fatty acid concentration on northeastern US dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8486-8497, 2016.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8716-8732, 2016.

4 CAPÍTULO III: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE EM DIETA COM BAIXO TEOR DE AMIDO, ASSOCIADA OU NÃO A UMA FONTE DE AÇÚCAR, SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS

Resumo

O balanceamento de dietas por aminoácidos vem sendo difundido em fazendas leiteiras ao passo que pesquisas tem sugerido a interação entre os metabolismos proteico e energético na fisiologia de vacas leiteiras. Dessa forma o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, em dietas com baixos teores de amido, associada ou não a uma fonte extra de açúcar, sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras no meio da lactação. Utilizou-se no experimento 80 vacas multíparas da raça Holandês com $2,4 \pm 0,6$ lactações, $159,5 \pm 67,7$ dias em lactação, $36,53 \pm 4,46$ kg/d de leite, $3,28 \pm 0,65\%$ G e $3,12 \pm 0,22\%$ P, onde os animais foram alocados em blocos em arranjo de tratamento fatorial em um dos 4 tratamentos: Controle, uma dieta com 23% de amido (%MS) sem suplementação de açúcar ou Met (CONT); Alta energia, com suplementação de 1,7%MS de açúcar cristal, porém sem Met (AE); Controle, sem suplementação de açúcar, porém com suplementação de Met (MET); e a interação de ambos os tratamentos (META-E). O período experimental total foi de 28 dias, sendo os três primeiros dias utilizados para coleta de dados como covariáveis. As variáveis mensuradas foram produção e composição do leite, tanto em percentual como em kg/d. O grupo AE produziu mais leite fluido (2,2 kg/d; $P < 0,01$) e leite corrigido para energia (1,6 kg/d; $P < 0,01$), além de aumento na produção diária de proteína e lactose. A suplementação de MET aumentou a concentração de P% (0,10 pontos percentuais $P < 0,01$) e tendeu a aumentar a de G% (0,13, $P = 0,11$), porém sem nenhuma resposta em produção diária de sólidos. Interessantemente, houve redução de 0,09 pontos percentuais no teor de lactose ($P = 0,02$) nos grupos suplementados com MET. Houve um aumento significativo de 7,9% ($P = 0,05$) na eficiência do uso do N por kg de proteína produzida na interação entre MET e AE. A amplitude de resposta a suplementação de MET parece não ser apenas aditiva, mas dependente do perfil energético da dieta, onde dietas pouco glicogênicas parecem ser menos interativas com AA.

Abstract

The balancing of diets by amino acids has been widespread in dairy farms while research has suggested the interaction between protein and energy metabolism in the physiology of dairy cows. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of ruminal protected methionine supplementation in low-starch diets, associated or not with an extra source of sugar, on the productive performance of dairy cows in mid-lactation. Eighty multiparous Holstein cows with 2.4 ± 0.6 lactations, 159.5 ± 67.7 days in lactation, 36.53 ± 4.46 kg/d of milk, $3.28 \pm 0.65\%$ Fat and $3.12 \pm 0.22\%$ Protein were used in the present experiment, where the animals were allocated in blocks in a factorial treatment arrangement in one of 4 treatments: Control, a diet with 23% starch (%DM) without sugar supplementation or Met (CONT); High energy, with 1.7% DM supplementation of crystal sugar, but without Met (AE); Control, without sugar supplementation, but with Met supplementation (MET); and the interaction of both treatments (METAE). The total experimental period was 28 days, with the first three days used for data collection as covariates. The variables measured were milk production and composition, both in percentage and in kg/d. The AE group produced more fluid milk (2.2 kg/d; $P < 0.01$) and energy corrected milk (1.6 kg/d; $P < 0.01$), in addition to an increase in the daily production of protein and lactose. MET supplementation increased the concentration of Protein % (0.10 percentage points $P < 0.01$) and tended to increase that of Fat % (0.13, $P = 0.11$), but without any response in daily production of solids. Interestingly, there was a 0.09 percentage point reduction in lactose content ($P = 0.02$) in the MET-supplemented groups. There was a significant increase of 7.9% ($P = 0.05$) in the efficiency of N use per kg of protein produced in the interaction between MET and EA. The amplitude of response to MET supplementation appears to be not only additive, but dependent on the energy profile of the diet, where low-glycogenic diets appear to be less interactive with AA.

4.1 INTRODUÇÃO

Com mudanças emergentes nas últimas décadas nas principais bacias leiteiras do Brasil, com bonificações por percentual de sólidos cada vez mais impactantes na rentabilidade de fazendas leiteiras, o balanceamento de aminoácidos (AA) passa a ter maior atenção por parte dos nutricionistas. Isto acontece porque a produção de proteína, mas também a produção de gordura do leite, podem ser incrementados pela disponibilidade de substrato (AA por exemplo), e pelo potencial catalítico enzimático na glândula mamária, sendo o aporte de AA considerado um dos principais reguladores deste processo de síntese (YODER et al., 2020).

Dentre os AA mais comumente identificados como deficientes em dietas a base de milho e soja, destaca-se a metionina (Met) por sua consistente resposta em proteína do leite quando suplementada (LEAN et al., 2018; PATTON, 2010). Mais recentemente detectou-se que tal AA não apenas possui efeito sobre a produção de proteína, mas também sobre a síntese de gordura na glândula mamária, o que foi demonstrado em diversos trabalhos (JUNIOR et al., 2021; CARDOSO et al., 2021; LIANG et al., 2019; TOLEDO et al., 2017). Mais recentemente o aporte do AA Met foi inserido na equação de predição de produção de gordura do leite do NASEM (2021). Qual o real mecanismo com que é modulada esta relação ainda não está bem estabelecido, mas evidências apontam para mecanismos pós absorptivos de regulação transcricional do processo de síntese de gordura no tecido mamário (HAN e ZHANG, 2021; LI et al., 2019; LUO et al., 2018; QI et al., 2018). Do ponto de vista econômico do mercado brasileiro de leite, o retorno marginal da suplementação de Met é obviamente maior ao contabilizar não apenas aumentos diretos dos teores de proteína, mas também com incremento dos teores de gordura. Compreender como manipular dietas para obter tais resultados ao se balancear AA, traz um apelo que vai além do biológico.

A eficiência com que os AA fornecidos pela dieta são utilizados pela vaca para os processos de síntese não são fixos, e podem ser modificados pelo aporte e perfil energético com que este animal está exposto (LAPIERRE et al., 2020; DANIEL et al., 2016). Estudos manipulando perfil/suprimento de AA e energia simultaneamente, demonstram que fontes glicogênicas de energia são eficientes em modular tanto resposta como eficiência de uso de AA, seja por efeitos do próprio substrato como a glicose, ou efeitos indiretos via aumento de insulina circulante (DANES et al., 2020; NICHOLS et al., 2016; RIUS et al., 2010).

Porém, estudos utilizando fontes de carboidratos como açúcares simples como aporte energético e sua relação com AA são escassos, quase inexistentes. Interações observadas em experimentos realizados com infusão abomasal de fontes energéticas podem implicar algumas limitações com relação a sua aplicação prática de balanceamento de dietas. Recomendações de relação energia por proteína (Mcal EM/g PM) sugeridas por alguns modelos nutricionais em

avaliações dietéticas, podem refletir de fato uma interação biológica e pós absorptiva observada em estudos prévios. Porém, detalhes importantes são simplesmente desconsiderados nesta abordagem. Sabidamente, dietas altamente fermentescíveis podem induzir à saciedade mais rapidamente (ALLEN, 2000), reduzir a digestibilidade da FDN (KRAUSE e OETZEL, 2006) e potencialmente reduzir a síntese de gordura e proteína na glândula mamária. Estes efeitos, sejam eles de caráter ruminal ou não, podem ser moduladores de resposta na adoção direta desta metodologia de balanceamento de AA e energia em dietas de vacas lactantes, e por isso estudos com características similares aos encontrados em rebanhos comerciais são fundamentais para a consolidação deste conhecimento teórico.

O uso de açúcares como fontes energéticas na dieta de vacas lactantes possui características interessantes, entre elas a associação de um carboidrato de alta taxa de degradação ruminal, porém sem efeito de queda de pH, ou até mesmo em algumas circunstâncias de aumento de pH observado (PENNER e OBA, 2009). Do mesmo modo, o perfil fermentativo com a suplementação de açúcar comumente induz a uma maior produção de butirato ao invés de propionato ou lactato, sendo não apenas uma moeda energética com baixa indução a resposta insulinêmica, mas também de alta taxa de absorção pelo epitélio ruminal e potencial substrato para síntese direta de gordura do leite (VALLIMONT et al., 2004).

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente, associada ou não a uma fonte extra de açúcar (sacarose), sobre o desempenho produtivo em vacas leiteiras no meio da lactação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em um rebanho leiteiro comercial localizado em Castro, região centro-oriental do Estado do Paraná, Brasil. Para tanto, 80 vacas multíparas da raça Holandês com $2,4 \pm 0,6$ lactações, $159,5 \pm 67,7$ dias em lactação, $36,53 \pm 4,46$ kg/d de leite, $3,28 \pm 0,65\%$ gordura e $3,12 \pm 0,22\%$ proteína no início do período experimental. Os animais permaneceram alojados em estrutura tipo *free-stall*, e ordenhados três vezes ao dia, às 05:00 h, 13:00 h e às 21:00 h. O período experimental total foi de 28 dias, sendo que os três primeiros dias consistiram em coleta de informações para serem utilizadas como covariável.

O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados com um arranjo fatorial de tratamentos 2 x 2, onde as vacas elegíveis a participar do experimento foram separadas em 20 blocos contendo 4 animais cada.

A bloqueio foi realizada em função da produção de leite média dos 5 dias que antecederam o início do experimento, dias em lactação e ordem de parição. Os 4 animais de cada bloco foram distribuídos aleatoriamente para receber cada um dos 4 tratamentos distintos em um esquema fatorial 2 x 2 (suplementação ou não de Met e suplementação ou não de açúcar). No decorrer do experimento, 5 vacas foram removidas do experimento por apresentarem mastite clínica.

4.2.1 DIETAS EXPERIMENTAIS

Os tratamentos consistiram no fornecimento da dieta convencional da fazenda, com baixo teor de amido comparativamente a uma dieta comumente praticada em rebanhos comerciais da região, isolada ou com a adição de uma fonte de açúcar (sacarose), juntamente com a suplementação ou não de Met protegida ruminalmente (Smartamine M[®], Addiseo). A dieta basal foi formulada utilizando o modelo AMTS, e a composição nutricional e balanço proteico e energético das dietas experimentais estão descritos na Tabela 8. Os teores de Met utilizados foram embasados nos conceitos até então sugeridos para o modelo AMTS (SCHWAB et al., 2009; WHITEHOUSE et al., 2009) de 2,40% de Met como proporção da PM. O adensamento energético com uma fonte de açúcar foi formulado para atingir 5,5% de açúcar total na MS, nível encontrado com melhor resposta em produção de leite corrigida para energia em estudo meta-analítico de Ondarza et al. (2017). Assim, os 4 tratamentos foram:

- a) Controle, sem suplementação de açúcar ou Met (CONT);
- b) Alta energia, com suplementação de açúcar, porém sem Met (SUG);
- c) Controle, com suplementação de Met (MET);
- d) Alta energia, com suplementação de açúcar e com suplementação de Met (SUG+MET).

As composições das dietas e seus teores nutricionais, ajustadas de acordo com as análises bromatológicas prévias obtidas pela fazenda, estão apresentados na Tabela 9.

A dieta foi fornecida na forma de dieta total misturada (TMR), uma vez ao dia, às 05:00 h da manhã, em quantidade suficiente para se obter cerca de 5% de sobras antes do próximo trato. Para os tratamentos MET e SUG+MET, 14 g de Smartamine M[®] (Adisseo) foram fornecidos *top dressed*, juntamente com milho grão moído, perfazendo o total de 100 g de suplemento/cabeça/dia (Met + milho). Para os grupos SUG e SUG+MET, 400 g de açúcar cristal (citar marca) foram fornecidos uma vez ao dia, também via *top dress*. Para os grupos que não receberam Met, o milho também foi fornecido na forma de placebo. Ambos os tratamentos

foram realizados individualmente, quando contidas no canzil, após a ordenha da manhã às 05:00 h. O consumo dos tratamentos foi monitorado de modo visual, para garantir o consumo de sua totalidade.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO (EM PERCENTAGEM DE MATÉRIA SECA) DAS DIETAS COM OU SEM ADIÇÃO DE AÇÚCAR, E COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL

Ingredientes (% MS)	CON	MET	AE	METAE
Silagem de Milho	33,5	33,5	33,0	32,9
Silagem Pré Secada de Azevém	11,2	11,2	11,0	11,0
Fubá de Milho	26,0	25,9	25,5	25,5
Farelo de Soja	16,8	16,8	16,5	16,5
Refinazil Úmido	9,6	9,6	9,4	9,4
Núcleo Mineral e Vitamínico ¹	3,0	3,0	2,9	2,9
Açúcar	0,0	0,0	1,7	1,7
Smartamine M [®]	0,0	0,06	0,0	0,05

¹Núcleo Mineral e Vitamínico: Mg 35 g/kg, Na 85 g/kg, Cl 80 g/kg, Ca 190 g/kg, P 24 g/kg, S 4.000 mg/kg, K 9.900 mg/kg, Cu 450 mg/kg, Zn 2.300 mg/kg, Fe 2.000 mg/kg, Mn 1.800 mg/kg, I 25 mg/kg, Co 30 mg/kg, Se 15 mg/kg, F 300 mg/kg, VitA 156.000UI/kg, VitD 51.500UI/kg, VitE 1.000UI/kg, Biotin 35 mg/kg, Cr 20 mg/kg, Monensin 510 mg/kg, Saccharomyces cerevisiae 1,40x10⁵ UFC/kg.

TABELA 9 - NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS, ESTIMADAS COM BASE NO MODELO NASEM (2021)

Composição Nutricional	CON	MET	AE	METAE
Proteína Bruta, %MS	17,9	17,9	17,6	17,6
Proteína degradável no rúmen, %MS	11,4	11,4	11,2	11,2
Fibra em detergente neutro %MS	29,8	29,8	29,3	29,3
FDNfor, %MS ¹	21,2	21,2	20,8	20,8
Fibra em detergente ácido, %MS	15,5	15,5	15,1	15,1
Amido, %MS	23,3	23,3	23,0	23,0
Açúcar, %MS	3,9	3,9	5,5	5,5
Extrato Etéreo, %MS	3,3	3,3	3,2	3,2
Cálcio, %MS	0,60	0,60	0,58	0,58
Fósforo, %MS	0,45	0,45	0,42	0,42
Suprimento estimado PM, g/d	2795	2803	2857	2866

Lisina, %PM	6,4	6,42	6,47	6,45
Metionina, %PM	2,1	2,40	2,1	2,40
Lisina:Metionina	3,06	2,68	3,06	2,70
Met:EM ²	0,91	1,04	0,91	1,04

¹Fibra em detergente neutro oriunda de foragem. ²Relação metionina e energia metabolizável.

As amostras dos alimentos foram coletadas semanalmente, secas em estufa de circulação forçada a 55°C e moídas a 1 mm em moinho tipo "Willey", onde sequencialmente determinou-se a matéria seca (MS) total em estufa a 105°C por 16 horas (Silva e Queiroz, 2009), proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldahl e matéria mineral (MM) por incineração a 550°C, por 4 horas. Foram determinados ainda os teores de fibra em detergente neutro (FDN), conforme VAN SOEST et al. (1991), utilizando-se α -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozymes Latin América Ltda.), e fibra em detergente ácido (FDA), segundo GOERING e VAN SOEST (1970). Análise de extrato etéreo (EE) seguiu as recomendações de SILVA E QUEIROZ (2009). As análises foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal da UFPR, em Curitiba, Paraná.

4.2.2 DESEMPENHO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

A produção de leite foi mensurada individualmente, durante os três primeiros dias que antecederam o início dos tratamentos, uma vez na semana durante todo o período experimental, e por mais 3 dias consecutivos nos três últimos dias do período experimental. As amostras para análise de composição do leite foram coletadas individualmente e separadamente durante as primeiras nove ordenhas, que foram posteriormente utilizadas como covariável, bem como nas últimas 9 ordenhas do experimento, realizadas com uso de amostrador automático de leite disponível no próprio equipamento de ordenha.

Amostras de leite foram enviadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Associação Paranaense dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, para análise dos teores de gordura, proteína, lactose e nitrogênio ureico no leite (NUL) (BENTLEY, 2007). Posteriormente foram estimadas as produções, em kg/vaca/dia, de cada componente do leite, além da produção de leite corrigida para energia e a energia secretada no leite em Mcal/vaca/dia (BOERMANN et al., 2015). Quanto à excreção de N, além do NUL, foi expressa também em g/kg de proteína no leite, NULPPP, (WATTIAUX e CRUMP, 2014).

No último dia do período experimental, foram estimados o peso corporal, com uso de fita métrica para aferição do perímetro torácico e a avaliação do escore de condição corporal (ECC) dos animais, por dois avaliadores independentes devidamente treinados. O ECC foi avaliado de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda (WILDMAN et al., 1982), com frações de 0,25. Os valores finais foram obtidos através da média das avaliações dos dois avaliadores.

4.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro Wilk, homogeneidade das variâncias através do teste de Levene e exclusão dos outliers com base no valor do *r* de Student. Os dados de produção de leite foram analisados como medidas repetidas no tempo, usando o procedimento MIXED do SAS (2002) para testar as diferenças nas médias de tratamento. Mudanças ao longo do tempo são esperadas nessas variáveis dependentes, assim, um modelo com análise de medidas repetidas foi considerado adequado. Os dados de composição do leite, peso e ECC foram analisados usando o procedimento MIXED sem o efeito de tempo, uma vez que foram coletadas apenas no período final do experimento.

A suplementação de MET, energia (EN) e a interação entre MET e EN (MET*EN) foram avaliados como efeitos fixos no modelo. Dentre as variáveis, as mesmas coletadas durante o período de covariáveis foram incluídas como covariável no modelo. O modelo também incluiu o efeito de vaca aninhada dentro do bloco como efeito aleatório. As estruturas de covariância avaliadas foram autorregressivas de primeira ordem (AR-1), não estruturada (UN), simétrica composta (CS) e toeplitz (TOEP), e foram definidas de acordo com o menor valor obtido para “Akaike’s Information Criterion Corrected” (AICC), sendo assim foi escolhida a estrutura AR-1.

Para todas as variáveis dependentes as médias foram obtidas através do comando LSMEANS. A comparação entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey quando houve significância na análise de variância. Durante a interpretação e discussão dos resultados fora adotado como efeito significativo quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P < 0,10$.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados de produção de leite, produção de leite corrigida para energia, composição e produção diária de sólidos estão demonstrados na Tabela 10. O fornecimento adicional de

energia oriunda de uma fonte simples de açúcar, em uma dieta de baixa concentração de amido, aumentou a produção de leite (2,2 kg/d; $P<0,01$) e de leite corrigida para energia (1,6 kg/d; $P<0,01$), enquanto a suplementação de Met neste cenário não incrementou a produção.

Já para a composição do leite, a concentração de proteína total do leite foi aumentada com a suplementação de Met (0,10 pontos percentuais; $P<0,01$), o teor de gordura demonstrou tendência de aumento (0,13 pontos percentuais; $P=0,11$), e a concentração de lactose foi reduzida (0,09 pontos percentuais; $P=0,02$). Não houve efeito da suplementação de AA sobre a produção de sólidos em kg/dia. Enquanto isso, o aumento da concentração de açúcar na dieta para 5,5%MS aumentou a produção de proteína total e lactose (60 g/d; $P=0,01$; e 120 g/d; $P<0,01$, respectivamente).

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar o desempenho da suplementação de MET em uma dieta de baixa concentração de amido, quando um maior aporte de energia era fornecido via açúcar. As respostas frente ao aumento da concentração de açúcar na dieta (5,5%MS) são condizentes ao observado em outros estudos e revisões (ONDARZA et al., 2017), com aumentos de produção de leite e de leite corrigido para energia, bem como incremento da produção de proteína do leite. De maneira geral, maiores concentrações de açúcar no rúmen trazem uma maior produção de PMic quando em dietas com altas quantidades de PDR oriunda de proteína verdadeira (AA e peptídeos) (HALL, 2017), sendo uma das principais razões dos aumentos comumente observados em proteína do leite, já que poucos dados são disponíveis com relação a efeitos pós absorptivos de dietas com maiores concentrações de açúcares simples, e os poucos que temos indicam que efeitos à resposta da insulina ou à concentração de glicose por exemplo são inexistentes (PENNER e OBA, 2009).

O perfil fermentativo do rúmen é evidentemente modificado com suplementações de açúcar na dieta, ou com a sua inclusão substituindo amido. Aumentos consistentes das concentrações molares de butirato são observadas, em concomitância com incrementos no pH médio do rúmen e de seu nadir (RAVELO et al., 2022). O aumento da produção de butirato pode maximizar a absorção do epitélio ruminal de ácidos graxos voláteis e o transporte de glicose (PENNER et al., 2011; OBA et al., 2015) que por sua vez justificam os aumentos encontrados em digestibilidade do FDN nos experimentos e as maiores produções de leite, sem necessariamente aumentos da produção de propionato, assim como os observados no presente estudo. As concentrações de NUL, bem como da excreção de N por kg de proteína produzida sugerem um claro desbalanço entre carboidratos de rápida fermentação e proteína de degradação ruminal (FOX et al., 2004). Embora o aumento de energia via açúcar não impactar a concentração de N ureico no leite, este tornou mais eficiente o uso da N comparativamente a

produção de proteína diária devido ao seu estímulo sobre a produção de leite fluido e consequente uso da proteína ingerida.

A resposta da suplementação de um aminoácido, especificamente Met neste caso, sobre produção de sólidos do leite tem sido compreendida como independente e aditiva a ingestão energética da dieta, independente de seu perfil (LAPIERRE et al., 2020; NASEM, 2021). Porém, no presente experimento, o ajuste de Met na PM em dietas de baixa concentração de amido não demonstrou o mesmo comportamento. Nenhum aumento da produção diária de sólidos foi observado, tampouco em produção de leite ou excreção diária de energia, apenas pequenos efeitos e tendências sobre concentração de proteína e gordura respectivamente, e uma intrigante redução do teor de lactose do leite. Concomitante, houve uma interação entre AA e energia para a concentração de gordura do leite e a eficiência de uso do N, uma vez que menos gramas de N foram excretados por kg de proteína produzida diariamente.

O aumento de eficiência de uso seja da PM ou dos AA com aumentos da ingestão de energia são documentados em outros experimentos, sejam eles na interação com fontes amiláceas (LAPIERRE et al., 2020), glicogênicas (DANES et al., 2020) ou de outra origem (NICHOLS et al., 2018), mesmo que em diversas circunstâncias, assim como possivelmente em nosso estudo, este comportamento seja um reflexo do aumento de produção de leite em si. Isso nos sugere que, em dietas em que possivelmente concentrações de glicose e insulina estejam reduzidas, a resposta da Met pode não ser independente como o sugerido. O não efeito “compensatório” da ingestão energética adicional oriunda da sacarose nos tratamentos METAE sobre a produção de proteína do leite por exemplo, nos fornecem mais evidências que possíveis limitações da resposta da Met se deva pelas baixas concentrações de amido na dieta, ou seja, que existe uma dependência de glicose e insulina circulante como sinalização celular no processo de biossíntese da glândula mamária, regulado via complexo mTORC1 (SAXTON e SABATINE, 2017), e que a amplitude de resposta de um AA pode ser dependente não apenas na concentração energética mas também de seu perfil.

Como não possuímos dados de consumo de MS individual dos animais, ao observar a redução da concentração de lactose nos tratamentos com Met, especulamos que isso pode ser reflexo de uma redução no consumo de MS ou algum efeito pós absoritivo relacionado ao uso da glicose. Alguns processos de síntese, como por exemplo a de triglicerídeos na glândula mamária, podem gerar uma demanda de uso da glicose que vai além da formação de lactose propriamente dita, seja ela na formação de glicerol ou para obtenção de NADPH via pentose fosfato e saturação da gordura na síntese *De Novo* (SALTER et al., 2006; BICKERSTAFFE et al., 1974). Cenários onde a oferta desta pentose circulante é limitada, porém a síntese de sólidos

estimulada por algum fator dietético, o dreno de glicose gerado deve ser levado em consideração ao observar reduções nas concentrações de lactose do leite.

4.4 CONCLUSÃO

A suplementação isolada de Met em uma dieta de baixa concentração de amido não impactou consistentemente a produção de sólidos como o esperado ou previamente já relatado, o que contradiz o conceito de efeito individual e aditivo de AA e energia sobre a produção e composição do leite, principalmente proteína. A pequena interação observada com uma fonte de energia pouco gliconeogênica, nos sugere que a interação entre energia e AA da dieta vai além de seu aporte total em Mcal, apenas como fonte de C, mas também é dependente de seu perfil fermentativo e suas possíveis respostas metabólicas sobre a sinalização celular que controlam os processos de transcrição. Fontes energéticas que reconhecidamente produzem menos precursores de glicose parecem exercer menores interações com o metabolismo de AA.

TABELA 10 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MET, AÇÚCAR, OU ASSOCIAÇÃO DE AMBOS, EM DIETAS DE BAIXO AMIDO, SOBRE DADOS DE DESEMPENHO PRODUTIVO

	Tratamentos					Valor-P		
	CON	MET	AE	METAE	EPM	SUG	MET	METAE
Produção de Leite, kg/d	34,2	32,7	35,4	35,1	0,28	<0,01	0,47	0,24
Produção de Leite corrigido para energia, kg/d, kg/vaca/dia	35,0	33,9	36,2	36,0	0,29	<0,01	0,73	0,28
Proteína, %	3,35	3,46	3,39	3,43	0,02	0,76	<0,01	0,88
Proteína, kg/d	1,16	1,12	1,19	1,19	0,01	0,01	0,87	0,18
Gordura, %	3,55	3,89	3,76	3,77	0,04	0,18	0,11	0,04
Gordura, kg/d	1,23	1,25	1,32	1,31	0,01	0,26	0,81	0,52
Lactose, %	4,56	4,51	4,65	4,51	0,02	0,29	0,02	0,17
Lactose, kg/d	1,56	1,48	1,65	1,59	0,02	<0,01	0,14	0,72
Nitrogênio ureico no leite, mg/dL ¹	22,55	23,56	23,99	22,09	0,29	0,55	0,62	0,20
NULPPP, g/kg ²	7,71	8,29	7,9	7,14	0,13	0,02	0,82	0,05
Peso Vivo, kg/vaca	712,5	708,45	713,1	718,77	7,3	0,44	0,31	0,76
Escore de condição corporal	2,98	2,95	2,94	2,91	0,5	0,66	0,54	0,55

¹NUL. ²Gramas de N excretado por kg de proteína total produzida no leite.

4.5 REFERÊNCIAS

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000.

BENTLEY INSTRUMENTS, INC. *Bentley Sistema Combinado 2300. Operator's manual*. Chaska: Bentley, 2007. 115 p.

BICKERSTAFFE, R.; ANNISON, E. F.; LINZELL, J. L. Metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Agricultural Science*, v. 82, p. 71–85, 1974.

BOERMAN, J. P. et al. Effects of partly replacing dietary starch with fiber and fat on milk production and energy partitioning. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 7264-7276, 2015.

CARDOSO, F. et al. Effect of protein level and methionine supplementation on dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5467-5478, 2021.

DANES, M. A. C. et al. Post-ruminal supplies of glucose and casein, but not acetate, stimulate milk protein synthesis in dairy cows through differential effects on mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6218-6232, 2020.

DANIEL, J. B. et al. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal*, v. 10, p. 1975–1985, 2016.

FOX, D. G. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology*, v. 112, p. 29-78, 2004.

HALL, M. B. Sugars in dairy cattle rations. In: *26th Tri-State Dairy Nutrition Conference*. Columbus: Ohio State University, 2017. p. 135–146.

HAN, M.; ZHANG, M. The regulatory mechanism of amino acids on milk protein and fat synthesis in mammary epithelial cells: a mini review. *Animal Biotechnology*, v. 2, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1080/10495398.2021.1950743.

JUNIOR, V. C. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLOS ONE*, v. 16, 2021.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, p. 215–236, 2006.

LAPIERRE, H. et al. Review: Impact of protein and energy supply on the fate of amino acids from absorption to milk protein in dairy cows. *Animal*, v. 14, Supl. 1, p. s87-s102, 2020.

LAPIERRE, P. A. et al. Impact of starch and energy on amino acid requirements of lactating cows. In: *Cornell Nutrition Conference*. Cornell University, Syracuse, NY, 2020.

LEAN, I. J. et al. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 340-364, 2018.

LI, P. et al. CRT2 is a key mediator of amino acid-induced milk fat synthesis in mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019.

LIANG, S. L. et al. Effect of N-acetyl-l-methionine supplementation on lactation performance and plasma variables in mid-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 5182-5190, 2019.

LUO, C. et al. GlyRS is a new mediator of amino acid-induced milk synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, p. 2973–2983, 2018.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE (NASEM). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press, 2021.

NICHOLS, K. et al. Glucose supplementation stimulates peripheral branched-chain amino acid catabolism in lactating dairy cows during essential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 1145–1160, 2016.

ONDARZA, M. B.; EMANUELE, S. M.; SNIFFEN, C. J. Effect of increased dietary sugar on dairy cow performance as influenced by diet nutrient components and level of milk production. *The Professional Animal Scientist*, v. 33, p. 700-707, 2017.

OBA, M.; MEWIS, J. L.; ZHINING, Z. Effects of ruminal doses of sucrose, lactose, and corn starch on ruminal fermentation and expression of genes in rumen epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 586–594, 2015.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2105-2118, 2010.

PENNER, G. B.; STEELE, M. A.; ASCHENBACH, J. R.; McBRIDE, B. W. Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *Journal of Animal Science*, v. 89, p. 1108–1119, 2011.

PENNER, G. B.; OBA, M. Increasing dietary sugar concentration may improve dry matter intake, ruminal fermentation, and productivity of dairy cows in the postpartum phase of the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 7, p. 3341-3353, 2009.

QI, H. et al. Methionine promotes milk protein and fat synthesis and cell proliferation via the SNAT2-PI3K signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 11027-11033, 2018.

RAVELO, A. D.; VYAS, D.; FERRARETTO, L. F.; FACIOLA, A. Effects of sucrose and lactose as partial replacement to corn in lactating dairy cow diets: a review. *Translational Animal Science*, v. 6, 2022.

RIUS, A. G. et al. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2034–2043, 2010.

SALTER, A.; LOCK, A.; GARNSWORTHY, P.; BAUMAN, D. E. Milk Fatty Acids: Implications for Human Health. *Recent Advances in Animal Nutrition*, p. 1-18, 2006.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, v. 168, p. 960-976, 2017.

SCHWAB, C. G. et al. Reevaluation of the breakpoint estimates for the NRC (2001) required concentrations of lysine and methionine in metabolizable protein for maximal content and yield of milk protein. *Journal of Dairy Science*, v. 92, Suppl. 1, p. 103, 2009.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos – Métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 23-29.

TOLEDO, M. Z. et al. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. *PloS One*, v. 12, e0189117, 2017.

YODER, P. S. et al. Effects of jugular infused methionine, lysine, and histidine as a group or leucine and isoleucine as a group on production and metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 3, p. 2387-2404, 2020.

WATTIAUX, M. A.; CRUMP, P. M. Exploring milk urea-N excretion as a nutritional and environmental management tool for the dairy industry. *Journal of Animal Science*, v. 92, (E-Suppl. 2), p. 350, 2014.

WILDMAN, E. E. et al. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 495-501, 1982.

WHITEHOUSE, N. et al. Comparison of optimal lysine and methionine concentrations in metabolizable protein estimated by the NRC (2001), CPM-Dairy (v.3.0.10) and AMTS. Cattle (v.2.1.1) models. *Journal of Dairy Science*, v. 92, Suppl. 1, p. 103, 2009.

VALLIMONT, J. E. et al. Effects of replacing dietary starch with sucrose on ruminal fermentation and nitrogen metabolism in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 4221-4229, 2004.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

REFERÊNCIAS

ALLEN, M. S. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 598–1624, 2000.

APELO, S. A.; KNAPP, J. R.; HANIGAN, M. D. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 4000-4017, 2014.

APPUHAMY, J. A. D. R. N. et al. Effects of jugular-infused lysine, methionine, and branched-chain amino acids on milk protein synthesis in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 1952-1960, 2011.

ARDALAN, M.; REZAYAZDI, K.; DEHGHAN-BANADAKY, M. Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 94, p. 259-265, 2010.

AWAWDEH, M. S. Rumen-protected methionine and lysine: effects on milk production and plasma amino acids of dairy cows with reference to metabolisable protein status. *Journal of Dairy Research*, v. 83, p. 151-155, 2016.

BELL, A. W.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T. R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 59, p. 119-126, 2000.

BATEMAN II, H. G. et al. Accuracy and precision of computer models to predict passage of crude protein and amino acids to the duodenum of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 649-664, 2001.

BEQUETTE, B. J. et al. Amino acid exchange by the mammary gland of lactating goats when histidine limits milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 765-775, 2000.

BERNARD, J. K. et al. Response of cows to rumen-protected lysine after peak lactation. *The Professional Animal Scientist*, v. 30, p. 407-412, 2014.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1370-1381, 2003.

CARLSON, D. B.; WOODWORTH, J. C.; DRACKLEY, J. K. Effect of L-carnitine infusion and feed restriction on carnitine status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 2367-2376, 2007.

CARDOSO, F. et al. Effect of protein level and methionine supplementation on dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5467-5478, 2021.

CARON, A.; RICHARD, D.; LAPLANTE, M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, v. 35, p. 321-348, 2015.

CETIN, I. et al. Improved lactational performance in dairy cows supplemented with methionine or rumen-protected choline during the transition period. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, v. 24, p. 289-293, 2018.

CHEN, Z. H. et al. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 1978-1988, 2011.

DALEY, V. L.; BOMPADRE, T. F. V.; HANIGAN, M. D. Effects of absorbed amino acids on the milk fat yield: A meta-analytic approach. *Journal of Dairy Science*, v. 92 (Suppl. 1), 2019.

DANES, M. A. C. et al. Post-ruminal supplies of glucose and casein, but not acetate, stimulate milk protein synthesis in dairy cows through differential effects on mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6218-6232, 2020.

DANIEL, J. B. et al. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal*, v. 10, p. 1975-1985, 2016.

DOEPEL, L. et al. Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 1279-1297, 2004.

DOEPEL, L. et al. Effect of postruminal glutamine supplementation on immune response and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 3107-3121, 2006.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2259-2273, 1999.

FAGUNDES, M. A. et al. Influence of supplementing a methionine derivative, N-acetyl-l-methionine, in dairy diets on production and ruminal fermentation by lactating cows during early to mid lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 7082-7094, 2018.

FEHLBERG, L. K. et al. Feeding rumen-protected lysine prepartum increases energy-corrected milk and milk component yields in Holstein cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 12, p. 11386-11400, 2020.

FESSENDEN, S. W. et al. Ruminal bacteria and protozoa composition, digestibility, and amino acid profile determined by multiple hydrolysis times. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 7211-7226, 2017.

FOX, D. G. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology*, v. 112, p. 29-78, 2004.

FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O. Predicting Dietary Amino Acid Adequacy for Ruminants. In: *Amino acids in animal nutrition*, p. 389, 2003.

GIALLONGO, F. et al. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 3292–3308, 2015.

GIALLONGO, F. et al. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 4437-4452, 2016.

GINGRAS, A. C. et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & Development*, v. 15, p. 2852–2864, 2001.

GIRARD, C. L. et al. Effects of dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine on lactational performance and folate metabolism of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 660-670, 2005.

HAGEN, A. et al. Effect of dietary monensin supplementation and amino acid balancing on lactation performance by dairy cows. *The Professional Animal Scientist*, v. 1, p. 278-283, 2015.

HAN, M.; ZHANG, M. The regulatory mechanism of amino acids on milk protein and fat synthesis in mammary epithelial cells: a mini review. *Animal Biotechnology*, v. 2, p. 1-11, 2021.

HANIGAN, M. et al. Predicting ruminally undegraded and microbial protein flows from the rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 10, p. 10.3168-19672, 2020.

HANIGAN, M. D. et al. Predicting post-absorptive protein and amino acid metabolism. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 47, 2018.

HOLZ, M. K. et al. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, v. 123, p. 569–580, 2005.

HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, p. 1981–1991, 2009.

JENSEN, C.; WEISBJERG, M.; HVELPLUND, T. Evaluation of methods for estimating the amino acid supply to the duodenum of microbial, endogenous and undegraded feed protein on maize silage diets fed to dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v. 131, p. 1-24, 2006.

JUNIOR, V. C. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLOS ONE*, v. 16, 2021.

KENNEDY, B. K.; LAMMING, D. W. The mechanistic target of rapamycin: the grand Conductor of metabolism and aging. *Cell Metabolism*, v. 23, p. 990–1003, 2016.

LANSARD, M. et al. L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *The Journal of Nutrition*, v. 141, p. 75-80, 2010.

LAPIERRE, H. et al. Review: Impact of protein and energy supply on the fate of amino acids from absorption to milk protein in dairy cows. *Animal*, v. 14, p. S87-S102, 2020.

LAPIERRE, H. et al. Amino acid requirements for lactating dairy cows: Reconciling predictive models and biology. In: *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, Dept. Anim. Sci., Cornell Univ., Ithaca, NY, p. 39-60, 2007.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 122, p. 3589-3594, 2009.

LARSEN, M. et al. Abomasal protein infusion in postpartum transition dairy cows: Effect on performance and mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 5608-5622, 2014.

LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*, v. 7, p. 1640-1650, 2013.

LEAN, I. J. et al. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 340-364, 2018.

LEE, C. et al. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 1885–1902, 2015.

LEE, C. et al. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 5253–5268, 2012a.

LEE, C. et al. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 6042-6056, 2012b.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LIANG, S. L. et al. Effect of N-acetyl-L-methionine supplementation on lactation performance and plasma variables in mid-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 5182-5190, 2019.

LI, P. et al. CRTC2 is a key mediator of amino acid-induced milk fat synthesis in mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019.

LI, S. et al. Essential amino acid ratios and mTOR affect lipogenic gene networks and miRNA expression in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 7, p. 44, 2016.

LI, W. et al. Effect of distillers dried grains with solubles diet supplemented with rumen-protected lysine and methionine on milk production and milk amino acids in the lactating cow. *International Journal of Dairy Technology*, v. 67, p. 10.1111/1471-0307.12085, 2013.

MACKLE, T. R. et al. Effects of insulin and amino acids on milk protein concentration and yield from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1512–1524, 1999.

MITCHELL, H. H.; BLOCK, R. J. Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *Journal of Biological Chemistry*, v. 163, p. 599–620, 1946.

MISCIATTELLI, L. et al. Milk production, nutrient utilization, and endocrine responses to increased postruminal lysine and methionine supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 275-286, 2003.

MORRIS, D. L.; KONONOFF, P. J. Effects of rumen-protected lysine and histidine on milk production and energy and nitrogen utilization in diets containing hydrolyzed feather meal fed to lactating Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 7110-7123, 2020.

MULLINS, C. R. et al. Short communication: Supplementing lysine and methionine in a lactation diet containing a high concentration of wet corn gluten feed did not alter milk protein yield. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 5300-5305, 2013.

NASEM. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press, 2021.

NICHOLS, K. et al. Feed and nitrogen efficiency are affected differently but milk lactose production is stimulated equally when isoenergetic protein and fat is supplemented in lactating dairy cow diets. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 7857–7870, 2018.

NICHOLS, K. et al. Glucose supplementation stimulates peripheral branched-chain amino acid catabolism in lactating dairy cows during essential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 1145–1160, 2016.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 958-969, 2003.

NRC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7. ed. rev. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

O'CONNOR, J. D. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 1298-1311, 1993.

ORDWAY, R. S. et al. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5154-5166, 2009.

OSORIO, J. S. et al. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics*, v. 48, p. 231-256, 2016.

OSORIO, J. S. et al. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 7437-7450, 2014.

OSORIO, J. S. et al. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postparturient cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 6248-6263, 2013.

PAZ, H. A. et al. Evaluation of rumen-protected lysine supplementation to lactating dairy cows consuming increasing amounts of distillers dried grains with solubles. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 7210-7222, 2013.

PACHECO, D. et al. Comparison of net portal absorption with predicted flow of digestible amino acids: Scope for improving current models? *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 4747-4757, 2006.

PATTON, R. A. et al. Relationships between circulating plasma concentrations and duodenal flows of essential amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 4707-34, 2015.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2105-2118, 2010.

POTTS, S. B. et al. Production responses to rumen-protected choline and methionine supplemented during the periparturient period differ for primi- and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 6070-6086, 2020.

PSZCZOLKOWSKI, V. L.; ARRIOLA APELO, S. I. The market for amino acids: understanding supply and demand of substrate for more efficient milk protein synthesis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 11, p. 108, 2020.

QI, H. et al. Methionine promotes milk protein and fat synthesis and cell proliferation via the SNAT2-PI3K signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 11027-11033, 2018.

RIUS, A. G. et al. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 2034–2043, 2010.

RULQUIN, H. et al. Infusion of glucose directs circulating amino acids to the mammary gland in well-fed dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 87, p. 340–349, 2004.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B.; HUBER, J. T. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature review. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 3182–3213, 1998.

SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, Telma Teresinha; PIRES, Alexandere Vaz; OLIVEIRA, Simone Gisele de. *Nutrição de ruminantes*. 1. ed. Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandere Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, 2006. cap. 10, p. 255-284.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, v. 168, p. 960-976, 2017.

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-year review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10094-10112, 2017.

SCHWAB, C. G. et al. Reevaluation of the breakpoint estimates for the NRC (2001) required concentrations of lysine and methionine in metabolizable protein for maximal content and yield of milk protein. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 103 (Suppl 1), 2009.

SCHWAB, C. G. et al. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 1254-1270, 1976.

SOCHA, M. T. et al. Extent of methionine limitation in peak-, early-, and mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 1996-2010, 2008.

SOCHA, M. T. et al. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 1113-1126, 2005.

SOK, M. et al. Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 5241-5249, 2017.

ST-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 2487-2497, 2005.

SWANEPOEL, N. et al. Effects of ruminally protected methionine and/or phenylalanine on performance of high producing Holstein cows fed rations with very high levels of canola meal. *Animal Feed Science and Technology*, v. 205, p. 10-22, 2015.

SWANEPOEL, N. et al. Amino acid needs of lactating dairy cows: Impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v. 157, p. 79-94, 2010.

TANG, X. et al. Comprehensive profiling of amino acid response uncovers unique methionine-deprived response dependent on intact creatine biosynthesis. *PLOS Genetics*, v. 11, n. 4, e1005158, 2015.

TEBBE, A. W.; WEISS, W. P. Concurrent and carryover effects of feeding blends of protein and amino acids in high-protein diets with different concentrations of forage fiber to fresh cows. 1. Production and blood metabolites. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 5583-5600, 2021.

TOLEDO, M. Z. et al. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. *PLOS ONE*, v. 12, n. 12, e0189117, 2017.

VYAS, D.; ERDMAN, R. A. Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5011-5018, 2009.

WANG, C. et al. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3661-3670, 2010.

WHITE, R. R. et al. Evaluation of the National Research Council (2001) dairy model and derivation of new prediction equations. 1. Digestibility of fiber, fat, protein, and nonfiber carbohydrate. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 3591-3610, 2017.

WHITEHOUSE, N. et al. Comparison of optimal lysine and methionine concentrations in metabolizable protein estimated by the NRC (2001), CPM-Dairy (v.3.0.10) and AMTS. Cattle (v.2.1.1) models. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 103 (Suppl. 1), 2009.

YEPE, F. L. et al. Effect of rumen-protected branched-chain amino acid supplementation on production-and energy-related metabolites during the first 35 days in milk in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 6, p. 5657-5672, 2019.

YODER, P. S. et al. Effects of jugular infused methionine, lysine, and histidine as a group or leucine and isoleucine as a group on production and metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 2387-2404, 2020.

ZHAO, K. et al. Effects of rumen-protected methionine and other essential amino acid supplementation on milk and milk component yields in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 7936-7947, 2019.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 8716-8732, 2016.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 057/2021, referente ao projeto de pesquisa **“Suplementação de metionina protegida ruminantemente e sua relação com o metabolismo energético em vacas leiteiras de alta produção”**, sob a responsabilidade de **Rodrigo de Almeida** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em 15/10/2021.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Outubro/2021 até Novembro/2021
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> (bovino)
Número de animais	480
Peso/Idade	690kg/3 a 6 anos
Sexo	Fêmea
Origem	Fazenda comercial em Castro, Paraná, Brasil

*A autorização para início da pesquisa se torna válida a partir da data de emissão deste certificado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 057/2021, regarding the research project **“Rumen protected methionine supplementation and its relationship with lipid metabolism in high-producing dairy cows”** under **Rodrigo de Almeida** – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, on 2021, October 15th.

Purpose	Research
Validity	October/2021 until November/2021
Specie/Line	<i>Bos taurus</i> (bovine)
Number of animals	480
Weight/Age	1521lb/From 3 to 6 years old
Sex	Female
Origin	Commercial Farm in Castro, Paraná, Brazil

*The authorization to start the research becomes valid from the date of issue of this certificate.

**Alex Maiorka
Coordenador**

**Comissão de Ética no Uso de Animais
AG - UFPR**