



FABIANA DE FREITAS CARDOSO

**EFFECTS OF PROTEIN LEVEL AND METHIONINE
SUPPLEMENTATION DURING THE PERIPARTURIENT
PERIOD OF DAIRY COWS**

**LAVRAS MG
2018**

FABIANA DE FREITAS CARDOSO

**EFFECTS OF PROTEIN LEVEL AND METHIONINE SUPPLEMENTATION
DURING THE PERIPARTURIENT PERIOD OF DAIRY COWS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Marina de Arruda Camargo Danes

LAVRAS MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cardoso, Fabiana de Freitas.

Effects of protein level and methionine supplementation during
the periparturient period of dairy cows / Fabiana de Freitas Cardoso /
Fabiana de Freitas Cardoso. – 2018.

56 p.

Orientadora: Marina A. Camargo Danes

Coorientador(a): Marcos Neves Pereira, Shawn S. Donkin,
Renata Apocalypse Nogueira Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2018

Bibliografia.

1. methionine. 2. transition period. 3. immune system. I. Danes,
Marina de Arruda Camargo. II. Pereira, Marcos Neves. III. Donkin, Shawn S.
IV. Pereira, Renata Apocalypse Nogueira. V. Título.

FABIANA DE FREITAS CARDOSO

**EFFECTS OF PROTEIN LEVEL AND METHIONINE SUPPLEMENTATION
DURING THE PERIPARTURIENT PERIOD OF DAIRY COWS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de fevereiro de 2018.

Dr. Marcos Neves Pereira	UFLA/DZO
Dr. Shawn Donkin	Purdue University
Dra. Ana Paula Peconick	UFLA/DMV

Dra. Marina A. Camargo Danes
Orientador

LAVRAS – MG

2018

Aos meus pais, Luis Márcio e Neide, que sempre estão ao meu lado

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luis Marcio e Neide e ao meu irmão Fabricio.

À minhas avós Ana e Alice, pelo exemplo e carinho.

À toda minha família, tios e primos que sempre torceram por mim.

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de Zootecnia por todos esses 7 anos de muito aprendizado.

Ao professor Marcos por sua grande contribuição na minha vida profissional e por toda oportunidade e ensinamentos

À professora Marina por todo companheirismo e ensinamentos passados ao longo do mestrado, que me fizeram melhor como pessoa e profissional.

Ao Grupo do Leite. Sem a ajuda de cada um de vocês nada disso poderia ser feito.

As bolsistas (Jenifer, Cecilia e Vitória) vocês são demais.

Aos amigos de pós-graduação, (Tatiane, Douglas, Eugênio, Ricardo, Naina, Júlia, Josiane, Izabella, Letícia e Rayanna)

À Renata por toda ajuda ao longo desses anos.

Ao Carlinhos, Sr. Antonio, Tião, Geraldo e Adriana da Fazenda São Francisco.

Ao professor Shawn Donkin, Brooklyn, Brittany, Erika, Jessica e Juliana da Universidade de Purdue, pelos ensinamentos, trabalho em grupo e amizade.

À querida Ariana por toda ajuda e companheirismo

Ao meu amado pai e ao DMV/ DZO- UFV na confecção das análises.

RESUMO

O início da lactação de vacas leiteiras é caracterizado por um balanço negativo de proteína e energia. Além da alta exigência nessa fase para o início da produção de leite, o consumo de matéria seca é baixo. Com isso, são necessárias estratégias de alimentação para aliviar o balanço negativo de nutrientes nesta fase. Em períodos de estresse, como em torno do parto, pode ocorrer imunodepressão, com a possibilidade de comprometer a capacidade das vacas em lidar com os desafios, tornando-as mais suscetíveis a doenças. O objetivo deste estudo foi examinar o efeito do aumento do aporte de proteína metabolizável e o ajuste no perfil de aminoácidos dessa proteína para vacas durante o período de pré-parto e início da lactação. Ao explorar este objetivo, examinamos o efeito de aumentar o nível de proteína da dieta com ou sem metionina protegida da degradação ruminal sobre o desempenho e a saúde das vacas leiteiras durante o período de transição e nos primeiros 45 dias de lactação. Quarenta e seis vacas foram blocadas com base na paridade (primíparas vs múltíparas) e data de parto e dentro de cada bloco foram distribuídas aleatoriamente para um dos três tratamentos: baixa proteína (LP), alta proteína (HP) ou alta proteína com inclusão de metionina protegida no rúmen (HPM). Os tratamentos foram oferecidos do dia -21 a 45 dias em relação ao parto. Trinta e nove vacas completaram o experimento. As vacas alimentadas com HPM consumiram 2,8 kg/d mais matéria seca do que as vacas no tratamento de LP durante o pré-parto. Não encontramos diferenças no peso corporal e no escore de condição corporal entre os tratamentos no pré e pós-parto. As vacas alimentadas com HP produziram 2,5 kg/d mais leite durante os primeiros 45 dias de lactação do que as vacas alimentadas com LP, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. A adição de metionina à dieta HP não aumentou a produção de leite. Maior suplementação protéica (HP) em relação a níveis mais baixos de proteína na dieta (LP) reduziu a relação leite/ingestão de matéria seca, aumentou o nitrogênio ureico no leite e tendeu a aumentar o nitrogênio ureico no plasma. Vacas alimentadas com HPM apresentaram menor concentração plasmática de interleucina (IL) 1 em relação as vacas no tratamento LP. A concentração sanguínea de linfócitos foi maior no tratamento de baixa proteína em relação aos tratamentos de alta proteína (HP e HPM). No entanto, as concentrações plasmáticas de glicose, creatinina, cálcio, IL10 e TNF α e as concentrações séricas de insulina, ácidos graxos não esterificados e beta-hidroxibutirato, não diferiram entre os tratamentos durante o período experimental.

Palavras-chave: Metionina, período de transição, proteína do leite, sistema imune

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Temperature- Humidity Index (THI) inside the tie- stall during the experimental period. Temperature: 21.0 ± 5.5 °C. Humidity: 78.1 ± 16.0 %. THI: 72.6 ± 6.6
..... 55
- Figura 2 Dry matter intake (DMI) pre- partum. P-values: < 0.01 for treatment, 0.34 for the interaction of treatment*day. DMI post- partum, P-values: 0.27 for treatment, 0.57 for the interaction of treatment*day on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) and Milk yield. P-values: 0.12 for diet, 0.78 for the interaction of treatment*day.....
.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ingredient and nutrient composition of diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) during pre- and post-partum.....	48
Tabela 2	Diet evaluation using the NRC model (2001) of diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) pre- and post-partum.....	49
Tabela 3	Health incidents low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).....	50
Tabela 4	Feed intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, udder edema, colostrum, urine pH and excretion of allantoin on diets with low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) pre- and post- partum.....	51
Tabela 5	Insulin (Uu/mL), plasma urea nitrogen (mg/dL), glucose (mg/dL), NEFA (mmol/L), BHBA (mmol/L) and creatinine (mg/dL) concentrations on days, +7, +14 and +21 on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).....	52
Tabela 6	Calcium, IL- 1, IL- 10 and TNF α concentrations on day of calving on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).....	53
Tabela 7	Hemogram in day + 21 post- partum 12 hours post- morning feeding, on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS	13
2.2 SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA PARA VACAS LEITEIRAS.....	15
2.3 BALANCEAMENTO DE DIETAS PARA AMINOÁCIDOS	18
2.4 O USO DA METIONINA	19
2.5 RESPOSTA IMUNOLOGICA	21
2.6 CITOCINAS.....	21
REFERÊNCIAS	22
ARTIGO.....	27

1 INTRODUÇÃO

O manejo de vacas leiteiras no período de transição, que corresponde a 21 dias antes do parto até os 21 dias após o parto, ainda hoje é um grande desafio para técnicos e produtores de leite. Neste período busca-se maximizar a ingestão de nutrientes, já que próximo ao parto há queda no consumo voluntário de matéria seca (IMS), levando ao balanço negativo de nutrientes no período pós-parto. Este fato é observado quando a ingestão de nutrientes não atende à demanda nutricional do animal por energia e proteína levando à mobilização de reservas corporais. Mesmo que haja a necessidade de mobilização de reservas corporais para atender à exigência do animal, se a mobilização for em excesso, a chance de ocorrência de distúrbios metabólicos como cetose e fígado gorduroso aumenta.

A utilização de teores mais altos de proteína bruta (PB) na dieta pode ser uma estratégia para minimizar o balanço proteico negativo no pós-parto e disponibilizar maiores quantidades de aminoácidos (AA) no intestino para atender as exigências do animal e aumentar a produção de leite (CYRIAC et al., 2008; LAW et al., 2009). Porém, níveis muito altos de proteína podem resultar em prejuízos tanto econômicos quanto ambientais devido ao aumento no custo da dieta, problemas reprodutivos e excreção de nitrogênio (N) no ambiente.

A deficiência de AA essenciais na proteína metabolizável (PM) é outra preocupação importante durante o período de transição e pode ter efeito negativo sobre a produção de leite no início da lactação. Estratégias no balanceamento de AA com perfil adequado na PM traz benefícios que incluem aumento da produção de leite e dos componentes do leite, redução na excreção de N por unidade de leite (SCHWAB, 2010).

Para atender as exigências de vacas leiteiras em AA essenciais na PM, a utilização de farelo de soja como o principal ingrediente proteico traz um complicante, por ser rico em lisina, porém deficiente em metionina. Neste caso, para que a relação lisina:metionina ideal para vacas leiteiras (CHEN et al., 2011) seja alcançada, há necessidade de suplementação dietética de metionina.

Para o sucesso no balanceamento de dietas, além de maximizar a produção de proteína microbiana no rúmen (PMic), a utilização de fontes de proteína não degradável no rúmen (PNDR) também é uma prática adotada. Entretanto, nessas situações novamente ocorrerá a preocupação em atingir a relação de lisina:metionina adequada, provavelmente

possibilitada apenas pela suplementação de metionina protegida da degradação ruminal. Além de importante para síntese de proteína do leite, a metionina tem outras funções importantes no metabolismo animal, relacionadas à exportação de triglicerídeos hepáticos, síntese de antioxidantes e participação no sistema imune. Essas funções aumentam a importância da metionina no período de transição de vacas leiteiras.

Nossa hipótese é que a oferta e o perfil de AA determinam a saúde e a produtividade de vacas em transição. O objetivo deste estudo foi examinar o efeito do aumento do suprimento de PM e ajustar o perfil de AA fornecido a vacas em transição durante o período pré- parto através do início da lactação. Na exploração deste objetivo, examinamos o efeito do aumento do nível protéico da dieta com ou sem RPMet sobre o desempenho e a saúde de vacas leiteiras durante o período de transição e início da lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Período de transição de vacas leiteiras

O período de transição é caracterizado como sendo as três últimas semanas que antecedem o parto até as três primeiras semanas após o parto (Drackley et al. 2005) e é considerado a fase de maior desafio na vida de uma vaca leiteira. As alterações metabólicas e hormonais que ocorrem nesta fase podem influenciar negativamente a produção e a saúde da vaca durante toda a lactação (GRUMMER, 2004).

Uma das mais drásticas mudanças durante o período de transição é a ingestão de alimentos. Em média, a IMS diminui 30% durante a última semana que antecede o parto e é uma das principais preocupações neste período (HAYIRLI et al., 2002). Embora este declínio esteja bem documentado, pouco se sabe sobre fatores que influenciam esse efeito. Hayirli et al. (2002) utilizaram dados de 699 vacas em transição para modelar a variação na IMS nos dias que antecedem o parto. De acordo com essa análise, dia da gestação, fatores animais, e fatores dietéticos explicaram 56,1, 19,7 e 24,2% dessa variação, respectivamente, em um modelo linear multivariado com r^2 de 0,18. Dessa forma, fica claro que a capacidade de manipulação da queda de IMS é baixa.

O manejo de vacas em transição é bastante focado em maximizar a IMS no pré-parto em busca de minimizar os problemas após o parto. No entanto, um trabalho feito na Universidade de Wisconsin nos Estados Unidos mostrou que a queda proporcional na IMS nesta fase pode ser tão preocupante quanto a quantidade consumida (MASHEK E GRUMMER, 2003). A quantidade ingerida no pré-parto foi bem correlacionada com IMS pós-parto e produção de leite, mas não com concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) ou triglicerídeos hepáticos no dia 1 após o parto. Para essas variáveis, a queda de IMS entre 3 e 1 semana pré-parto foi um melhor preditor (MASHEK E GRUMMER, 2003).

Nesta fase, juntamente com a queda na IMS, há um aumento na exigência de nutrientes pelo animal que são direcionados para o crescimento fetal, mamogênese e lactogênese (BELL, 1995; GRUMMER, 1995). Em função dessa assincronia entre a demanda por nutrientes e a IMS, as vacas passam por um período de balanço negativo de nutrientes, principalmente energia, proteína e cálcio (BELL, 1995). Em resposta ao balanço negativo de nutrientes, o animal mobiliza as próprias reservas corporais. Essa mobilização de reservas, em especial de tecido adiposo, tem interferência negativa nas

funções produtivas das vacas (BUTLER, 2003; ROCHE et al., 2009). De forma prática, o grau de mobilização das reservas corporais pode ser avaliado com base na concentração plasmática de AGNE e betahidroxibutirato (BHBA), que refletem o grau de mobilização de gordura corporal e a oxidação incompleta da gordura no fígado, respectivamente (LEBLANC, 2010).

O balanço energético negativo durante a transição e seu impacto na lactação subsequente têm sido alvo do interesse científico por muitas décadas. Um vasto número de pesquisas gerou algumas linhas de recomendação sobre como definir a densidade energética da dieta no período de transição (DANN et al., 2006, DOEPEL et al., 2002). Por outro lado, o balanço proteico negativo recebeu menos atenção, com um número muito menor de pesquisas, apesar das evidências de longa data deste concomitante problema (BELL et al. 1995).

O balanço proteico tem grande importância, especialmente no período de transição, já que diversos AA têm papel conhecido na resposta imunológica (LI et al., 2007) e sua exigência aumenta em momentos de desafios, como em torno do parto. Recentes pesquisas têm mostrado que a glândula mamária está muito responsiva ao aumento no aporte de PM e AA nos primeiros 30 dias em lactação (LARSEN et al., 2014, LEE et al., 2012). Além disso, a suplementação com metionina protegida da degradação ruminal durante o período de transição tem se mostrado benéfica para a IMS (ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017), desempenho (OSORIO et al., 2013; ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017) e saúde (OSORIO et al., 2013; OSORIO et al., 2014) das vacas no início da lactação.

Além do desafio nutricional, as vacas enfrentam um desafio imunológico associado ao período de transição. Nessa fase os animais estão susceptíveis a maior incidência e gravidade de distúrbios metabólicos e doenças infecciosas, já que a capacidade de resistir a esses desafios está comprometida (SORDILLO et al., 1995; SORDILLO et al., 2009; TREVISI et al., 2012). Os distúrbios metabólicos, como cetose, fígado gorduroso, deslocamento de abomaso e retenção de placenta, que ocorrem em torno do parto são problemáticos e podem afetar grandemente a produção das vacas na lactação (SORDILLO, 2016). Aproximadamente 75% das doenças em vacas leiteiras acontecem no primeiro mês após o parto (LEBLANC et al., 2006) e sabe-se que os transtornos metabólicos que afetam as vacas durante o período peri-parto estão inter-

relacionados (CURTIS et al., 1985). Além disso, existem perdas econômicas associadas aos distúrbios de saúde no período peri-parto que incluem reduções na capacidade produtiva e reprodutiva da vaca, aumento das taxas de mortalidade, custos de medicamentos antimicrobianos e vacinas (PRITCHETT et al., 2005). Por conta disso, as pesquisas mais recentes não estão focadas apenas na resposta ao desempenho animal, mas incluem avaliação de respostas do sistema imunológico e a interação destas com o desempenho (VAILATI- RIBONI et al., 2017, ZHOU et al., 2016, OSORIO et al., 2014).

Portanto, o manejo nutricional e a alimentação são fatores essenciais para maximizar o potencial de cada vaca durante todo seu ciclo produtivo, entretanto devem atender a inúmeros critérios que estão relacionados a esses eventos que afetam as mudanças na fisiologia nas últimas semanas de gestação (NRC, 2001). Recomendações relacionadas a adequação de proteína na dieta nesse período ainda são limitadas. O NRC (2001) tem limitação no cálculo de exigência de PM para a vaca no final da gestação, pois não considera a proteína necessária para renovação das células da glândula mamária. Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar a exigência de AA pelos animais durante esse período de mudanças metabólicas.

2.2 Suplementação proteica para vacas leiteiras

A nutrição de vacas leiteiras está em constante evolução conforme resultados de anos de pesquisa são incorporados nos modelos nutricionais comerciais. O uso de programas nutricionais refinados, combinado com a seleção genética para a produção de leite e o melhor manejo da fazenda contribuíram para mais do que duplicar a eficiência alimentar durante os últimos 100 anos (BRAVO E WALL, 2016).

No geral, estratégias nutricionais têm sido estudadas em busca de melhorar a eficiência de uso dos nutrientes, e isso não foi diferente para o balanceamento proteico. Atualmente é consenso que o tradicional balanceamento de dietas para PB não é adequado por não dividir as exigências dos microorganismos ruminais por proteína degradável no rúmen (PDR) e do animal por AA (NRC, 2001).

No período de transição, mais atenção ainda deve ser dada no momento de formular a dieta, devido ao aumento na demanda por PM e AA que ocorre no início da lactação (BELL et al., 2000). A alta demanda dos animais, juntamente com a incapacidade

das vacas de consumir proteína suficiente neste estágio de lactação contribuem para saldos negativos de PM e AA.

De forma simplificada, o balanceamento de proteína em dietas de ruminantes busca atender as exigências primeiramente dos microorganismos ruminais por PDR para maximizar a síntese de PMic e atender as exigências do animal por PM. O perfil de AA da PM pode ainda ser manipulado pela escolha de ingredientes que contribuirão para a PNDR, que junto com a PMic formam a PM. Ao trabalhar com níveis adequados de PDR e AA na PM podemos trabalhar com inclusões mais baixas de PB na dieta.

Atualmente, a redução na concentração de PB nas dietas de vacas leiteiras tem recebido mais atenção devido ao impacto econômico e ambiental do excesso da proteína na dieta. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA, 2004), a amônia emitida pela produção animal representa cerca de 50% das emissões antropogênicas totais de amônia, causando um impacto negativo ao ambiente. A redução da concentração de PB na dieta foi reconhecida como uma estratégia eficiente para reduzir a excreção de N através de uma redução da excreção de ureia pela urina (RAGGIO et al., 2004; AGLE et al., 2010). Por outro lado, o nível de PM abaixo das exigências pode levar a uma diminuição da produção de leite e proteína no leite (NRC, 2001; LEE et al., 2012; LEE et al., 2011b).

Uma ferramenta interessante para monitorar a eficiência de utilização do nitrogênio dietético (ENU) é a avaliação da concentração de nitrogênio ureico no leite (NUL). O NUL é especialmente útil para verificar a adequação de PDR e energia na forma de carboidratos fermentáveis no rúmen. Além disso, altas concentrações de NUL são indicativo de que as vacas não utilizaram a proteína eficientemente e, ao invés disso, deaminaram AA, gerando ureia. Estudos mostram correlação positiva entre NUL e as concentrações de PB na dieta (CARDER E WEISS 2017; BROWN E ALLEN 2013; LARSEN et al. 2014; LEE et al. 2015).

Além do fornecimento de AA via PM, uma das principais fontes de AA para a produção de leite no início da lactação é a proteína corporal (LARSEN e KRISTENSEN, 2009). Devido ao lento aumento da IMS e ao rápido aumento da produção diária de leite, a maior demanda extra de AA está no parto e na primeira semana pós-parto. É o período de maior saldo negativo de proteína (DOEPEL et al., 2002). A literatura sugere que, no

início da lactação, até 34% de caseína e 24% de lactose no leite poderiam ser derivados da proteína mobilizada do tecido corporal (BELL et al., 2000).

Aumentar os níveis de proteína durante o período pré-parto pode ser uma alternativa para aumentar a deposição de proteína na carcaça. Bell et al. (2000) sugere a validade dessa estratégia. Neste estudo (MCNEILL et al. 1997), níveis crescentes de PB na dieta de ovelhas pré-parto foram avaliados (12, 14, e 16%) e a dieta de 16% de PB foi a única que promoveu aumento na deposição de proteína muscular, que é justamente a proteína que estará disponível para ser mobilizada no pós-parto. Putnam e Vargas (1998) também observaram aumento na retenção de N em vacas leiteiras que receberam dietas com níveis crescentes de PB no final da gestação (10,6, 12,7, e 14,5%), mas sem efeito disso no desempenho pós-parto. No entanto, outros trabalhos já demonstraram efeitos benéficos do aumento de PB da dieta no pré-parto na incidência de distúrbios metabólicos (CURTIS et al., 1985) e no desempenho pós parto (VAN SAUN et al., 1993). Um bom indicador da mobilização da proteína corporal é a concentração de 3-metilhistidina no sangue, uma vez que é um sub-produto da degradação da proteína muscular. Um estudo avaliando dietas de proteína alta (17,0%) e baixa (12,5%) no pré-parto, encontrou maior concentração de 3-metilhistidina na primeira semana de lactação em vacas alimentadas com baixa proteína, indicando que a proteína do músculo esquelético estava sendo degradada anteriormente ao parto e, em maior medida, nessas vacas (DOEPEL et al., 2002).

Em relação à adequação proteica da dieta no pós-parto imediato, dois experimentos bastante intrigantes foram conduzidos recentemente. Larsen et al. (2014) e Larsen et al. (2015) avaliaram a infusão abomasal de caseína ou aminoácidos livres no perfil da caseína, respectivamente, durante os 30 primeiros dias de lactação, com objetivo de neutralizar a deficiência de PM nesse período. Em ambos os experimentos, o aumento no aporte de PM via infusão aumentou substancialmente a produção de leite (6 a 11 kg/d), sugerindo que a glândula mamária no início da lactação é altamente responsiva à maior disponibilidade de AA. Além disso, o aumento de produção de leite foi acompanhado por aumento na produção de proteína do leite e, com isso, o BPN não foi atenuado e o balanço energético foi acentuado, criando um potencial problema que não foi avaliado por causa do reduzido número de animais nesses experimentos. No entanto, conhecendo as diversas funções dos AA no organismo animal, é possível especular que parte dos AA fornecidos

na infusão tenham sido usados para melhoria da função hepática e do sistema imune, deixando as vacas mais preparadas para lidar com a maior mobilização de gordura corporal.

2.3 Balanceamento de dietas para aminoácidos

Os aminoácidos são divididos em dois grupos, os AA essenciais (AAE) são aqueles que não são sintetizados no organismo animal ou não o são em quantidade suficiente para atender à exigência. Já os aminoácidos não essenciais são aqueles que podem ser sintetizados no organismo. Os AAE são fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, valina, leucina e arginina. O teor de AAE e a proporção entre esses AA na PM no intestino é que determinam a eficiência de utilização dessa proteína pelo ruminante. Quando a PNDR de um ingrediente é de alto valor biológico (alta digestibilidade intestinal e com perfil interessante de AAE), como por exemplo o farelo de soja, o teor de proteína bruta da dieta pode ser reduzido, a eficiência de utilização da PM é otimizada, a excreção de ureia e de outros compostos nitrogenados é reduzida e o desempenho animal é maximizado.

A produção animal é limitada pelo AA menos disponível e o bom desempenho animal exige um equilíbrio adequado de AAE. A deficiência de qualquer um deles pode limitar a produção de leite, mesmo quando todos os outros AA estão em quantidades adequadas. Estratégias devem ser adotadas para aumentar as concentrações dos AA limitantes na PM, ou, do contrário, a eficiência do uso da PM para manutenção e produção de leite será comprometida. Um fator chave relacionado ao desempenho e EUN é o ajuste dos AAE limitantes na PM.

A lisina e a metionina foram identificadas como os AA mais limitantes para a síntese de proteínas do leite na maioria dos cenários de alimentação, sendo a metionina o primeiro limitador para vacas alimentadas com dietas com alta proporção de silagem de milho, grão de milho e farelo de soja (NRC, 2001). Além disso, a relação entre o aporte de lisina e metionina na PM parece ser também importante para utilização eficiente dessa proteína. O NRC (2001) recomenda que essa relação seja 3:1.

Devido a carência de uma recomendação específica para vacas em transição, estudos recentes testaram o efeito dessa mesma relação lisina:metionina (2,9-3:1) no

desempenho e saúde de vacas durante esse período (OSORIO et al., 2013; ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017).

Além da alta exigência em lisina e metionina, as vacas leiteiras tem alta exigência por um terceiro aminoácido, a histidina. Estudos têm indicado que histidina é o terceiro AA limitante para vacas de leite e a falta desses três aminoácidos diminuíram a produção de leite e o teor de proteína do leite (WEEKES et al. 2006). A histidina, além de aparecer em baixa concentração nos principais ingredientes proteicos, é deficiente também na proteína microbiana, quando esta é comparada ao perfil de AA da proteína do leite (NRC, 2001). Por isso, a deficiência de histidina é mais provável quanto maior for a participação de proteína microbiana na PM.

Giallongo et al. (2016b) relataram que a suplementação com histidina protegida em dietas deficientes em PM (atendendo 95% da exigência da PM), melhorou o desempenho, em relação a dieta adequada em proteína metabolizável, porém sem suplementação com aminoácidos. Portanto, em dietas que não estão atendendo a exigência de proteína metabolizável, a suplementação com lisina, metionina e histidina apresentam efeitos positivos sobre o desempenho produtivo. Mais uma vez, a importância do balanceamento da PM no desempenho dos animais foi evidenciado. A deficiência de PM diminuiu a IMS e a produção de leite das vacas em relação à dieta adequada. Melhora no desempenho também foi encontrada por Giallongo et al. (2015). A suplementação de histidina protegida no rumen, além da suplementação com metionina, aumentou a IMS e a concentração de proteína do leite. Com esses estudos, os autores sugerem que a histidina pode ter um efeito positivo na IMS de vacas leiteiras alimentadas com dietas deficientes em PM com base em silagem de milho. A adoção do conceito de balanceamento de dietas para AA continua a aumentar.

2.4 O uso da metionina

A importância da metionina como um dos AA mais limitantes para a síntese de proteína do leite em vacas está bem estabelecida. Além disso, a metionina assume papel importante na participação e regulação de vias metabólicas chaves para melhorar a saúde, sobrevivência, crescimento, desenvolvimento, reprodução e lactação. A metionina é responsável pela síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), podendo melhorar o transporte do gordura para fora do fígado (Durand et al., 1992 e

Bauchart et al., 1998). Apesar de já haver uma base de dados sólida sobre o papel da metionina no desempenho de vacas leiteiras (PATTON, 2010; ZANTON et al., 2014), ainda há um número limitado de estudos avaliando o efeito desse AA para vacas no período de transição.

Porém, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo dos benefícios da suplementação de AA durante o período de transição, com isso, uma forte linha de pesquisa vem sendo desenvolvida pela Universidade de Illinois, investigando os efeitos da metionina no desempenho e saúde de vacas em transição. No primeiro trabalho dessa linha, Osorio et al. (2013) observaram maior IMS, produção de leite, e teores de proteína e gordura no leite quando a metionina foi incluída na dieta (para manter a relação lisina:metionina em 2,9:1) de 21 dias antes da data prevista de parto até 30 dias após o parto. A resposta positiva foi repetida em mais dois trabalhos deste grupo, nos quais também foi observado aumento de IMS pré-parto (ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017).

O interesse em observar os efeitos da metionina na saúde do animal está relacionado aos desafios metabólicos enfrentados pelas vacas durante o período de transição, que podem resultar em função hepática reduzida, juntamente com inflamação aumentada e estresse oxidativo (OSORIO et al., 2014). Com a imunossupressão, a capacidade das vacas em resistir a doenças será comprometida. Alia-se a isso o conhecido papel da metionina como doadora de grupo metil no ciclo de 1C que acontece em todas as células do organismo animal. Por meio deste ciclo, a metionina influencia a formação de fosfatidilcolina, principal fosfolípido componente das lipoproteínas que exportam gordura do fígado, e a formação de antioxidantes poderosos (taurina e glutatona). De fato, melhor estado imunológico em resposta à suplementação de metionina na transição tem sido observado, incluindo melhor função neutrofílica e maiores concentrações de antioxidantes no tecido hepático (OSORIO et al., 2013; VAILATI-RIBONI et al., 2017; ZHOU et al., 2016; OSORIO et al., 2014). Além disso, biomarcadores presentes no sangue, leite e tecido hepático indicaram que pelo menos parte do efeito da suplementação de metionina na IMS e produção de leite pós-parto deve-se a um melhor estado imunológico (ZHOU et al., 2016).

Apesar da demanda evidente por mais experimentos, os resultados apresentados nessa série de estudos lançam novas ideias sobre o manejo e a alimentação de vacas em

transição. As evidências recentes sugerem que a suplementação com metionina pode ser uma ferramenta poderosa para melhorar o desempenho de vacas leiteiras, especialmente as de produção elevada.

2.5 Resposta imunológica

O sistema imunológico, é o conjunto de células, tecidos, órgãos e moléculas responsáveis pela retirada de agentes ou moléculas estranhas do organismo de todos os seres vivos. Diante de agentes estranhos o sistema imune atua com uma resposta coletiva e coordenadas das células e moléculas (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

Dividido em dois tipos de imunidade, o sistema imunológico se caracteriza por duas respostas: a imunidade inata que é a primeira linha de defesa do organismo e tem uma resposta rápida a inflamação e a imunidade adquirida ou adaptativa que é ativada quando há contato com agentes infecciosos e sua resposta à infecção aumenta a cada exposição sucessiva ao mesmo invasor, ela é dividida em dois tipos: a imunidade humoral, que gera uma resposta mediada por moléculas no sangue e nas secreções da mucosa, chamadas de anticorpos, produzidos pelos linfócitos B, e a imunidade celular, que gera resposta mediada pelos linfócitos T (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

2.6 Citocinas

O sistema imune conta com grande quantidade de células especiais, chamadas de leucócitos, e diversas substâncias que são responsáveis pela comunicação entre eles, chamados de mediadores moleculares, conhecidas por citocinas. Citocinas são grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes.

As citocinas podem induzir efeitos diferentes sobre as mesmas células alvo de forma separada ou simultaneamente. Podem também influir na ação de outras citocinas de forma antagônica ou sinérgica. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas (GONCALVEZ E DONALDI, 2004). Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e fator de necrose tumoral. As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (fator transformador de crescimento β) 2,4.

A interleucina 1 (IL-1) é produzida intensamente por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células dendríticas, mas também é expresso pelos linfócitos B, células NK e células epiteliais. A síntese de IL-1 pode ser induzida por TNF- α , IFN- α , β e γ , LPS, vírus e antígenos e é considerada uma citocina que se encaixa em um padrão Th2 da resposta imune (SONG et al., 2008).

A interleucina 10 (IL-10) é um fator desativante de macrófago, que atua nas células dos macrófagos a fim de produzir efeitos inibidores nas células T e natural killer. Ela também regula o crescimento e/ou diferenciação das células B, granulócitos, neutrófilos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. A IL-10 é produzida principalmente por células CD8+ ativadas (KAMANAKA et al., 2006)

Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) refere-se a um grupo de citocinas capaz de provocar a morte de células (apoptose) tumorais e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias (BERTHIER-VERGNES et al., 2005) O TNF- α é secretado principalmente por macrófagos. Seu mau funcionamento pode causar inflamações dolorosas em doenças auto-imunes, choque séptico e permitir o aparecimento de tumores.

REFERENCES

ABBAS A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia básica. Funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2^a ed. Elsevier, 2007.

AGLE, M.; HRISTOV, A. N.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P.; VADDELLA, V. K. Effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 1625-1637, 2010.

BRAVO, D. M.; WALL, E. H. The rumen and beyond: Nutritional physiology of the modern dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4939-4940, 2016.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2804-2819, 1995.

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. 119-12, 2000.

BERTHIER-VERGNES, O.; ERMOND, F.; FLACHER V.; MASSACRIER, C.; SCHMITT, D.; PEGUET-NAVARRO, J.; TNF-[alpha] enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Letters*, p. 579:3660, 2005.

BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, p. 211-218, 2003.

BROWN, W. E and M. S. Allen. Effects of intrajugular glucose infusion on feed intake, milk yield, and metabolic responses of early post- partum cows fed diets varying in protein and starch concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7132-7142, 2013.

CARDER, E. G and WEISS, W. P. Short- and longer-term effects of feeding increased metabolizable protein with or without an altered amino acid profile to dairy cows immediately post- partum. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 4528-4538, 2017.

CHEN, Z. H.; BRODERICK, G.A.; LUCHINI, N. D.; SLOAN, B. K.; DEVILLARD, E. 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.

CYRIAC, J. et al. Lactation performance of mid-lactation dairy cows fed ruminally degradable protein at concentrations lower than National Research Council Recommendations. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4704, 2008.

CURTIS, C. R.; ERB, H. N.; SNIFFEN, C. H.; SMITH, R. D.; KRONFELD, D. S. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2347-2360, 1985.

DANN, H. M.; LITHERLAND, N. B.; UNDERWOOD, J. P. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3563-3577, 2006.

DRACKLEY, J. K., DANN, H. M., DOUGLAS, G. N., JANOVICK GURETZKY, N. A., LITHERLAND, N. B. et al. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Journal of Animal Science**, v. 4, p. 323-344, 2005.

DOEPEL, L.; LAPIERRE, H.; KENNELLY, J. J. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to pre- partum energy and protein intake. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2315-2334, 2002.

FLOREANO, D.; & MATTIUSI, C. Bio-inspired artificial intelligence: theories, methods, and technologies. MIT press. 2008.

GONCALVES, M. A.; DONADI, E. A. IMMUNE CELLULAR RESPONSE TO HPV? CURRENT CONCEPTS. **BRAZ J INFECT DIS**, v.8, P. 1-9, 2004.

GRUMMER, R. R.; HOFHAN, P. C.; LUCK, M. L.; BERTICS, S. J. Effect of prepartum and postpartum dietary energy on growth and lactation of primiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 172, 1995.

GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Veterinary Clinics - Food Animal Practice**, v. 20, p. 447-470, 2004.

GIALLONGO, F.; HRISTOV, A. N.; OH, J.; FREDERICK, T.; WEEKS, H.; WERNER, J.; LAPIERRE, H.; PATTON, R. A.; GEHMAN, A.; PARYSLL, C. 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 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, 2016b.

HAYIRLI, A. R.; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E. V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3430-3443, 2002.

KAMANAKA, M.; KIM, S.T.; WAN, Y. Y.; SUTTERWALA, F. S.; LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E.; HARHAJ, E.; FLAVELL, R. A. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. **Immunity**, v. 25, p. 941-952, 2006.

LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic and whole body glucose metabolism in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1071-1083, 2009.

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

LARSEN, M.; GALINDO, C.; OUELLET, D. R.; MAXIN, G.; KRISTENSEN, N. B.; LAPIERRE, H. Abomasal amino acid infusion in post- partum transition dairy cows: Effect on splanchnic and mammary amino acid metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 7944-7961, 2015.

LAW, R. A.; YOUNG, F. J.; PATTERSON, D. C.; KILPATRICK, D. J.; WYLIE, A. R. G.; MAYNE, C.S. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1001-1012, 2009.

LEBLANC, S. Monitoring programs for transition dairy cows. **XXIV World Buiatrics Congress**, 2006.

LI, P.; YIN, Y. L.; LI, D.; KIM, S. W.; WU, G. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 237-252, 2007.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; HYLER, K. S.; CASSIDY, T. W.; LONG, M.; CORL, B. A.; KARNATI, S. K. R. Effects of dietary protein concentration and coconut oil

supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5544-5557, 2011b.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; CASSIDY, K. S.; LAPIERRE, H.; VARGA, G. A.; PARYS, C. 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, 2012b.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p. 29-35, 2010.

MCNEILL, D. M.; SLEPETIS R.; EHRHARDT R. A.; SMITH, D. M.; BELL A. W. Protein requirements of sheep in late pregnancy: partitioning of nitrogen between gravid uterus and maternal tissues. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 809-816, 1997.

MASHEK, D. G.; GRUMMER, R. R. Effects of long chain fatty acids on lipid and glucose metabolism in monolayer cultures of bovine hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2390-2396, 2003.

NRC. 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci. 2001. OSORIO, J. S.; JI, P.; DRACKLEY, J. K.; LUCHINI, D.; LOOR, J. J. 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.; TREVISI, E.; JI, P.; DRACKLEY, J. K.; LUCHINI, D.; BERTONI, G.; LOOR, J. J. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk 486 reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 7437-7450, 2014.

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.

PUTNAM, D. E.; VARGA, G. A. Protein density and its influence on metabolite concentration and nitrogen retention by Holstein cows in late gestation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1608-1618, 1998.

RAGGIO, G.; PACHECO, D.; BERTHIAUME, R.; LOBLEY, G. E.; PELLERIN, D. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3461-3472, 2004.

ROCHE, J. R., et al. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5769-5801, 2009.

SCHWAB, C. G. Balancing Diets for amino acids: Nutritional, environmental, and financial implications. In: **Tri-state Dairy Nutrition Conference**, p. 1-13, 2010.

SONG, S. H.; LEE, J. K.; LEE, N. W.; SAW, H. S.; KANG, J. S.; LEE, K.W. Interferon-gamma? A possible prognostic marker for clearance of high- risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol Oncol.* v, 108, p. 543-548, 2008.

SORDILLO, L. M.; CONTRERAS G. A.; AITKEN S. L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. ***Animal Health Research Reviews***, v. 10, p. 53-63, 2009.

SORDILLO, L. M.; PIGHETTI, G. M.; DAVIS, M. R. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, v. 49, p. 263-270, 1995.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. ***Journal Dairy Science***, v. 99, p. 4967-4982, 2016.

TREVISI, E.; AMADORI, M.; COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; BERTONI, G. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. ***Veterinary Sciences***, v. 93, p. 695-704, 2012.

US EPA (United States Environment Protection Agency). National Emission Inventory—Ammonia Emissions from Animal Husbandry Operations. US EPA, Washington, DC, 2004.

VAILATI-RIBONI, M.; ZHOU, Z.; JACOMETO, C. B.; MINUTI, A.; TREVISI, E.; LUCHINI, D. N.; LOOR, J. J. Supplementation with rumen-protected methionine or choline during the transition period influences whole-blood immune response in periparturient dairy cows. ***Journal Dairy Science***, v.100, p.1-11, 2017.

VAN SAUN, R. J.; IDLEMAN, S. C.; SNIFFEN, C. J. Effect of undegradable protein amount fed prepartum on postpartum production in first lactation Holstein cows. ***Jornaul Dairy Science***, v. 76, p. 236, 1993.

ZANTON G. L.; BOWMAN G. R ; VAZQUEZ-ANON, M AND RODE L. M. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. ***Journal of Dairy Science***, v. 97 7085-7101, 2014.

ZHOU, Z.; BULGARI, O.; VAILATI-RIBONI, M.; TREVISI, E.; BALLOU, M. A.; CARDOSO, F. C.; LUCHINI, D. N.; LOOR. J. J. Rumen-protected methionine compared with rumen protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the peripartal period. ***Journal of Dairy science***, v. 99, p. 8956-8969, 2016a.

WEEKES, T. L; LUIMES, P. H AND CANT, J. P. Responses to Amino Acid Imbalances and Deficiencies in Lactating Dairy Cows. ***Journal of Dairy science***, v. 89:2177-2187, 2006.

Capítulo 2 – ARTIGO

Artigo formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico
Journal of Dairy Science

**Effects of protein level and methionine supplementation during the
periparturient period of dairy cows**

**F. F. Cardoso,* J. Santos,* V. R. Caproni,* C. Parys,^δ R. A. N. Pereira,[‡] AP.
Peconick** S. Donkin,[‡] M. N. Pereira* and M. A. C. Danes***

*Department of Animal Sciences, University of Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil

^δEvonik Nutrition & Care GmbH, 63457 Hanau-Wolfgang, Germany

[‡]Minas Gerais Agricultural Research Enterprise, Epamig-URESM, Lavras, MG 37200-000, Brazil

** Department of veterinary, University of Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil

[‡]Department of Animal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN, USA,

¹**Corresponding authors:** Marina A. C. Danes and Marcos N. Pereira

E-mail: marina.danes@dzo.ufla.br; Phone: (+55 035) 9960-3101

E-mail: mpereira@dzo.ufla.br; Phone: (+55 035) 9963-7551

Address: Campus Universitário Caixa Postal 3037 372000-000 Lavras, MG,
UFLA.

ABSTRACT

Cows go through a significant negative protein balance during the first 30 days of lactation. Given the functional effects of amino acids (AA) on health and inflammation, especially in challenging periods such as around calving, higher levels of protein and specific AA may improve health and intake. The response of dairy cows to three protein supplementation strategies during the transition period and through the first 45 days in milk was evaluated. Forty-six cows were blocked based on parity (primiparous vs. multiparous) and date of calving and within each block were randomly assigned to one of three treatments: low protein (LP), high protein (HP) or high protein with inclusion of rumen protected methionine (HPM). Treatments were offered from day -21 to 45 days relative to calving. Pre- and post-partum diets were formulated to contain high metabolizable protein (MP) capacity, and HP and HPM presented higher MP balance compared to LP treatment. Thirty-nine cows completed the experiment. Cows fed HPM consumed 2.8 kg/d more DM than did cows on LP treatment during pre- partum. We found no differences on BW and BCS across treatments in pre- and post- partum. Cows fed HP produced 2.5 kg/d more milk during the first 45 days of lactation than cows fed LP, although it was not statistically significant. Addition of RPMet to the HP diet did not increase milk production. Greater protein supplementation (HPM) reduced milk/DMI, increased milk urea nitrogen, and tended to increase plasma urea nitrogen. There was a lower blood interleukin (IL) 1 concentration on the cows fed HPM compared to the diet LP. The lymphocyte concentration in the blood was higher in the treatment of low protein. However, blood concentrations of insulin, glucose, non-esterified fatty acid, creatinine, beta-hydroxybutyrate, calcium, IL10 and TNF α did not differ among treatments during

the experimental period. **Key words:** methionine, transition period, milk protein, immune system

INTRODUCTION

The transition period of a cow is undoubtedly one of the most critical stages in the dairy production system. This period is marked by a series of physiological changes that modify the cow's metabolism drastically and, if mismanaged, can cause great economic losses (Grummer, 1995). These changes include increasing fetal demands, development of the mammary gland, and the onset of milk synthesis (Bell, 1995). Coupled with low DMI, cows in the early post-partum period experience significant negative energy balance and are challenged in meeting lactation requirements (NRC, 2001). In addition, the demand for available amino acids (AA) increases at the beginning of lactation with the increase of milk protein synthesis (Bell et al., 2000). The abrupt increase in the demand for metabolizable protein (MP) and the inability of cows to consume sufficient protein at this stage of lactation contribute to negative MP and AA balances. Therefore, increasing the intestinal flow of MP and critical AA around calving has the potential to alleviate the negative AA balance and improve lactation performance (Larsen et al., 2014, Lee et al., 2012).

Studies suggest that lysine and methionine are the most limiting AA for milk protein synthesis under most feeding sceneries, with methionine being the first limiting AA for cows fed diets with a high proportion of corn silage, corn grain, corn by products and soybean meal (NRC, 2001). Thus, optimum concentrations of lysine and methionine in MP are required to maximize milk protein synthesis (Schwab et al., 1976). Previous studies have reported the beneficial effects of rumen-protected methionine (RPMet) on the performance of dairy cows when fed during the entire transition period (Zhou et al.,

2016; Osorio et al., 2013). Recent data show improvement in lactation performance when Rpmet supplementation during transition is extended, through peak lactation (Batistel et al., 2017).

Metabolic challenges during the transition period can result in reduced hepatic function, along with increased inflammation and oxidative stress (Osorio et al., 2014). Depressed immune function compromises the ability of cows to resist disease especially during the challenges associated with parturition. Recent studies have shown positive responses in the immunological status to methionine supplementation during the transition period in dairy cows (Vailati Riboni et al., 2017, Zhou et al., 2016, Osorio et al., 2014). Blood, milk and liver biomarkers have indicated that at least part of the effect of methionine supplementation on post- partum DMI and milk production is due to better immune status (Zhou et al., 2016).

We hypothesized that AA supply and profile determine the health and productivity of transition cows. The objective of this study was to examine the effect of increasing MP supply and adjusting the profile of AA supplied to transition cows during the close- up period through early lactation. In exploring this objective, we examined the effect of increasing the protein level of the diet with or without Rpmet on the performance and health of dairy cows during transition period and early lactation.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Management and Diet

All cows were in apparent good health at the beginning of the study. While 46 cows were blocked for the project, only 39 cows completed the study and could be used for the statistical analysis. The causes for removing cows from the study include injured

leg, injury in right radial nerve, abortion, twin birth, clinical mastitis and death, and one cow that did not give any milk after calving. Consequently, 39 Holstein transition cows (15 primiparous and 24 multiparous) were used to evaluate the response to three MP supplementation strategies.

The experimental design and procedures were conducted at Better Nature Research Center, located in Ijaci, Minas Gerais, Brazil. Protocols for this study were approved by the university's Committee for Animal Use in Research (CEUA – Comissão de Ética no uso de Animais - UFLA), under the protocol n. 049/2016. All cows were housed in a tie-stall system during pre- and post- partum periods. Environmental temperature and humidity at the center of the barn were measured at 30-min intervals with a digital thermometer (EasyLog-USB-2-LCD, Lascar Eletronics, Salisbury, United Kingdom) at 2.5 m from the floor. The Temperature-Humidity Index (THI) (Figure 1) was calculated according to Yousef (1985): $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$; where T = temperature (°C) and DP = dew point (°C). The 39 cows were fed one of three experimental diets starting at -18 ± 5 days pre- partum through 45 days post- partum with 13 cows per treatment.

Pre- and post- partum diets were formulated to contain two levels of MP, referred as low (LP), high (HP), as well as a HP diet with RPmet supplementation (Table 1). Diets were formulated using the dairy NRC 2001 model. Treatments with high MP (i.e. HP and HPM) had higher MP balance compared to the LP diet due to the increase in RUP from slowly degradable soybean meal (SoypassBR, Cargill). The HPM diet was adjusted to obtain a theoretical 3:1 ratio of lysine:methionine (Lys:Met) using a commercial rumen-protected methionine source (RPmet Mepron®, Evonik). Mepron is a source of DL-Methionine that resists ruminal degradation through an ethyl-cellulose film coating.

Pellets measure 1.8×3 mm and contain 85% DL-Met. The intestinal digestibility coefficient and rumen bypass of Mepron is 90% (Schwab, 1995) and 80% (Overton et al., 1996). The required amount of Mepron in the pre- partum HPM diet was 0.09% of DM, while the inclusion Mepron in the post- partum HPM diet was 0.13% of DM. We blocked cows in groups of 3 by parity (primiparous and multiparous) and estimated calving date within parity. Treatments LP, HP, and HPM were randomly assigned within group.

Cows were individually fed a TMR offered in equal proportions at 0700 and 1300. Batches of feed ingredients and the dose of Mepron were weighed using a precision scale. Mepron was premixed with a small amount of concentrate before being added to the batch for mixing. Dry matter intake was measured on days -18 ± 5 pre- partum through 45 days post- partum and milk yield from d 0 to 45.

Data and Sample Collection and Analysis

Diet nutrient composition was determined from feed samples that were collected daily and composited across weeks to a single sample per week. Similarly, ort samples were collected daily and were composited by cow pre and postcalving periods and week of study. Composite samples were oven-dried at 55°C for 72 h and then ground through a Willey mill fitted with a 1 mm sieve screen. The DM concentration was determined by drying at 100°C for 24 h and crude protein (CP) was determined by micro-Kjeldahl analysis (A.O.A.C, 1990). The ether extract (EE) was analyzed as proposed by Randall (1990) with submersion in petroleum ether (i.e. A.O.A.C). Ash content was analyzed by incineration at 550°C for 8 h. The ash free neutral detergent fiber (NDF) was determined by filtration in porous crucibles with addition of thermostable amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991). The non-fibrous carbohydrate (NFC) fraction was calculated as:

$NFC = 100 - (CP + EE + ASH + NDF)$. The values for NEL, RUP, and RDP were predicted using the NRC (2001).

Cows were milked 3 times per day starting at 0500, 1300, and 2000. Milk samples were collected twice a week from each milking and mixed in proportion to the milk yield. Samples were analyzed for fat, protein, lactose, total solids and MUN (Centralized Laboratory of the Parana State Holstein Breeders Association, Curitiba, Brazil). Protein, fat, lactose and total solids were analyzed with a Bentley 2000 equipment using the optical and infrared systems and the concentration of MUN was analyzed with a Chemspec 150 equipment (Bentley instruments). Milk energy (MILK E, Mcal/d) was calculated as: $[(0.0929 \times \% \text{ Fat}) + (0.0547 \times \% \text{ Protein}) + (0.0395 \times \% \text{ Lactose})] \times \text{kg of milk}$ (NRC, 2001). Energy corrected milk (ECM, kg/d) was calculated as: $\text{MILK E}/0.70$ (assuming 0.70 Mcal/kg for milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose). The 4% fat corrected milk (LCG 4%, kg/d) was calculated as: $(0.4 + 15 \times \% \text{ Fat}/100) \times \text{kg of milk}$ (Gaines, 1928). Feed efficiency was calculated by dividing milk yield by DMI, 3.5% ECM by DMI and FCM by DMI.

Body condition score (BCS) was evaluated using a 1 to 5 scale according to Wildman et al. (1982) by three independent evaluators on days -18 ± 5 and -8 ± 5 pre-partum, at calving (day 0), and at d 7, 14, 21, and 28 post-partum and values were averaged for each cow. Body weight was measured immediately after the morning milking on the same days as BCS. Udder edema was scored on d 0, 7, and 14 post-partum on a 1 to 10 scale according to Tucker et al. (1992). Colostrum yield was recorded and a sample was obtained for density evaluation. Urine spot samples were collected 3 times per day on d -10 pre-partum and +7 and +21 post-partum and analyzed for allantoin according to the procedure described by Chen and Gomes (1992), and creatinine was

analyzed with a laboratory kit (Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil). The relationship between allantoin and creatinine was used as an indicator of ruminal microbial growth. Urine pH was measured on day -8 ± 5 pre- partum with a pH meter on 3 samples obtained during the day.

Blood Collection and Analyses of Metabolites

Blood samples were collected from a coccygeal blood vessel on days -8 ± 5 pre-partum and 7, 14, and 21 post- partum for the evaluation of plasma glucose concentration. Samples were obtained immediately before the first daily feeding (T0) and 12 hours post-feeding (T12). Samples were collected with vacuum tubes containing EDTA and potassium fluoride and were centrifuged at 2,000-x g for 10 min. Plasma was removed and frozen at -20°C , pending analyzed with an auto biochemistry analyzer (HumaStar 300, Germany).

For the analysis of total calcium in plasma, samples were collected immediately after calving and 24 hours post- calving in tubes containing sodium heparin following the same procedure described above for samples used for glucose analysis. Samples of blood for analysis of plasma urea nitrogen (PUN) were collected on days -8 ± 5 pre- partum and + 7 and +21 post- partum at 0 hours before the first morning feeding and 2, 6, 9, 12 and 18 hours after the first feeding. Samples for PUN were collected in vacuum tubes containing EDTA, and analyzed with a commercial kit (Urea 500, Doles Reagents Laboratories, Goiania, Brazil).

For determination of BHBA and NEFA, blood samples were collected on days 8 pre- partum and ± 5 , +7, +14 and +21 post- partum, 12 hours after the first feeding. Samples were collected with vacuum tubes containing clot activator and serum was analyzed with an auto biochemistry analyzer with kit RB1007 and FA 115 to BHBA and

NEFA respectively (Bioclin BS-200E). For determination of creatinine, blood samples were collected on days -8 ± 5 pre- partum and +7, +14 and +21 post- partum at 12 hours after the first feeding and plasma was analyzed with an auto biochemistry analyzer (HumaStar 300, Germany).

For determination of blood insulin, samples were collected on days -8 ± 5 pre- partum and +7, +14 and +21 post- partum at 12 hours after the first feeding into vacuum tubes containing clot activator and serum was analyzed with the Multi-species radioimmunoassay kit (Millipore, Cat. # XL-85K). Bovine immune response was evaluated after an immune challenge on the day of calving. For the analysis of interleukin-1 (IL-1), interleukin-10 (IL-10) and TNF α , blood samples were collected on the day of the calving into vacuum tubes containing sodium fluoride and analyzed with the Bovine kit (NeoBiolab, Cambridge, MA). The cellular immune response was evaluated 21 days after calving, 12 hours post-feeding by hemogram within 1 hour of blood sampling in a commercial laboratory (Laboratório Santa Cecília, Lavras, Brazil).

Statistical Analysis

Feed intake, BW, and BCS data were analyzed separately for pre- partum and post- partum periods. Milk production and composition were analyzed for the post- partum period. Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS v.9.4 (SAS Institute, Inc. Cary, NC) with repeated measures according to the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + A_j + T_k + A*T + e_{ijk}.$$

Where: μ = the overall mean, B_i = the random effect of the block, A_j = the fixed effect of the treatment ($j = LP, HP, HPM$), T_k = the fixed effect of time ($j = \text{days}$), $A*T$ = the interaction of A_j and T_k , and e_{ijk} = the residual error. The mean square for the effect of cow nested within treatments was the whole plot error term to test the treatment effect.

The best covariance structure was defined by the Akaike's information criterion among AR(1), UN, and CS. Statistical significance and trends were considered at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.10$, respectively.

RESULTS

Health

The incidence of disorders is summarized in Table 3. Retained placenta were the most frequent health issues; however, their occurrence was similar between treatments.

Diets

Table 1 shows the ingredient and nutrient composition of the diets that were formulated using NRC (2001) model. Protein and energy balances were calculated using the NRC (2001) model with mean DMI, milk yield, BW, and BCS (Table 1).

Pre- partum measurements

The performance data in the pre- and post-partum period are presented in table 4 and Figure 2. Cows in the HP and HPM groups had greater DMI than LP fed cows (average difference of 2.8 kg/d; $P = 0.01$). We found no differences on BW, BCS and Urine pH across treatments ($P > 0.10$).

Production responses during early lactation

Post- partum performance results are presented in table 4 and Figure 2. There was no difference in post- partum DMI among treatments up to 45 DIM ($P = 0.27$). There was a tendency ($P = 0.12$) for greater milk yield of HP-fed cows. The response in lactose secretion to treatments followed the same trends as the response in milk yield. The HPM diet reduced feed efficiency compared to the LP diet ($P = 0.05$). Cows fed the HP diet had greater MUN than the ones fed LP diet ($P < 0.01$), and HPM was intermediate. Body

weight (BW), body condition score (BCS) and udder edema, were not affected by treatments ($P > 0.10$).

Blood parameters

Tables 5, 6 and 7 show the effect of treatments on blood parameters both pre- and post- partum. There was a tendency ($P = 0.09$) to increase PUN for cows fed diet HP. There was a lower ($P = 0.05$) interleukin-1 (IL1) concentration on cows fed HPM in relation to LP. Lymphocyte concentration in the blood was lower ($P = 0.03$) in the HP and HPM treatments relative to LP. Insulin, plasma glucose, NEFA, creatinine, BHBA, plasma calcium, IL10 and TNF α concentrations did not differ between treatments during the experimental period.

DISCUSSION

Ingredient, Nutrient Composition, and NRC Evaluation of Diets

The efficiency of dietary N for productive purposes is of paramount importance for dairy cow nutrition. An excess of N in the diet, above the requirements of the animal, has economic and environmental implications. On the other hands, reducing MP below the requirements can lead to a decrease in milk production and protein content in milk (NRC, 2001). To address the effects of different protein supplementation strategies on the performance of dairy cows in the transition period, cows were fed diets that differed in CP supply and post ruminal AA supply and profile from 18(\pm 5) days before calving through 45 DIM. In the present study, pre- and post- partum diets were formulated to contain low MP (LP treatment) or high MP (HP and HPM treatments). Table 2 shows that during pre- partum, all the treatments presented a positive MP balance, but in the post- partum period these values were negative. The decrease in MP balance at the beginning of lactation is a result of the increased requirements for milk production and DMI. That

is insufficient to meet demands. The HP and HPM diets had a less negative MP balance in relation to the low protein diet, which may be related to a higher DMI during pre-partum and due to higher CP content of HP diets for HPM. However, results show that there was no treatment difference for DMI during the post-partum period or treatment x day effects.

A key factor related to the performance of dairy cows is the adjustment of essential AA in MP. Strategies should be adopted to increase the concentration of the limiting AA in MP. Failure to meet optimal lys and met concentrations in MP can affect cow productivity and health due to inefficiencies in the use of MP (Batistel et al., 2017, Wang et al., 2010).

Effects on DMI, BW and ECC

The effects of rumen-protected methionine supplementation on DMI have been rather inconsistent. Osorio et al. (2013) and Batistel et al. (2017) found that supplementing RPmet during the transition period increased DMI. On the other hand, Socha et al. (2005) and Chen et al. (2011) did not find responses in DMI to methionine supplementation. In the present study, pre-partum DMI for cows fed the HPM treatment was, on average, 2.8 kg/day higher than those fed LP. Osorio et al. (2014a) and Zhou et al. (2016) related a greater intake of dry matter to a better response of the immune system of cows fed RPmet. In the present study, we found a similar response, in which there was an increase in DMI in the pre-partum for cows fed HPM and an increase in the blood concentration of IL1 that may be indicative of better immunological status (Vailati Riboni, et al., 2017) It is important to point out that we did not observe differences in post-partum DMI between treatments. In addition, BW and BCS were not different between pre and post-partum.

Milk Production and Composition

The difference in CP concentration between the LP and HP diet (16 vs 18% CP) tended to increase the average daily milk yield by 2.5 kg/d. Increased milk production may be due to a higher intake of dry matter, which is a major determinant of milk production (Hristov et al., 2004). Barton et al. (1996) reported similar results comparing diets with 13 vs 20%, while Mutsvangwa et al. (2016) and Doepel et al. (2002) found no difference in milk production (15 vs 17%; and 12.5% vs 17% CP diets).

Consistent with Ordway et al. (2009) and Benefield et al. (2009), we found no difference in milk production when RPMet was supplemented. On the other hand, Bastitel et al. (2017) Broderick et al. (2008), and Zhou et al. (2016b), found that cows produced more milk when supplemented with RPMet. Responses to the use of RPMet in the diet have been very inconsistent and further research is needed to confirm its influence on milk production (Patton, 2010).

In the present study, an increase in milk lactose concentration was observed in cows fed HP diets in the same way, as there was a numerical increase in milk production. This is due to the osmotic capacity of lactose, with a positive correlation between lactose content and milk production ($r = 0.84$; Broderick and Clayton, 1997). Similar results where there was increase in milk and lactose with greater protein supply were also found by Cabrita et al. (2011) and Larsen et al. (2014). The reduction in feed efficiency in the HPM diet compared to the LP diet is due to a numerically higher DMI (1.7 kg/d) but a smaller increase in milk production (1 kg/d). As expected, increasing diet CP levels from 16% to 18% resulted in an increase in MUN, which is consistent with Carder and Weiss (2017), who found a positive correlation between MUN and dietary CP concentrations. Similar findings were reported by Brown and Allen (2013), Larsen et al. (2014), and Lee

et al. (2015). Increasing dietary CP or AA supply beyond the requirements can increase feed costs and result in an increased nitrogen excretion, which may have environmental implications. The allantoin excretion was similar among treatments, which implies no changes in microbial protein. Therefore, the differences in MP were likely due to greater RUP and methionine supplies with the HP diets.

Blood Parameters

A higher concentration of nitrogen in the plasma is consistent with an increase in MUN. Researchers have reported that CP levels above requirement may be positively correlated with concentrations of blood urea (Law et al., 2009; Cabrita et al., 2011; Larsen et al., 2014). An increase in PUN with high MP indicates MP supply that may have exceeded the ability of the cow to use it effectively.

The use of blood biomarkers has been reported useful to assess the inflammatory status of cows. Zhou et al. (2016) found that higher concentrations of haptoglobin in the blood is an indicative of inflammation around parturition. The concentration of haptoglobin in the transition period has been of particular interest because of its rapid increase during an inflammatory event. Similarly, a positive correlation between haptoglobin and IL1 can indicate a proinflammatory state since IL1 can stimulate the transcription and synthesis of haptoglobin (Zhou et al., 2016). A low concentration of IL1 post- partum found in cows fed HPM has been reported as an indicator of better health (Vailati-Riboni et al., 2017), which suggests that the use of RPMet is a viable way of alleviating a detrimental response to the immune system.

Increasing the lymphocytes when there is an immunological challenge means that the cow can fight the challenge and minimize the negative effects at that time. In the present study, blood lymphocyte concentration was lower ($P= 0.03$) in the HP treatment.

However further studies are needed to elucidate the effect of methionine inclusion on lymphocyte proliferation in dairy cows.

CONCLUSIONS

Supplementation of a high protein diet with R_Pmet in pre- partum increased DMI. Methionine supplementation also decreased the concentration of IL1, which may be related to better immune function. In addition, cows fed high protein diets compared to a low protein diet tended to increase the average daily milk yield by 2.5 kg, as well as increased milk lactose content and urea nitrogen in milk. Insulin, plasma glucose, NEFA, creatinine, BHBA, plasma calcium, IL10 and TNF α concentrations were not responsive to protein supplementation strategies. Together these data point to a beneficial effect of increased MP pre- partum or feed intake that is linked to increased post ruminal methionine supply and improved immune status at calving.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), Evonik Nutrition & Care GmbH, 63457 Hanau-Wolfgang, Germany for funding the Project, and experimental farm Better Nature research/Minas Gerais – Brazil, and Laboratory of Animal Science (UFLA and UFV), and Pathology Laboratory of the Veterinary School (UFV). The study was supported by Federal University of Lavras (UFLA), Brazil.

REFERENCES

- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- Batistel, F., J. M. A. Arroyo, Bellingeri, L. Wang, B. Saremi, C. Parys, E. Trevisi, F. C. Cardoso, and J. J. Loo. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances

- performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100:7455-7467.
- Bell, A. W., W. S. Burhans, and T. R. Overton. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society*. 59:119-12.
- Bell, A. W., R. Slepatis, and R. A. Ehrhardt. 1995. Growth and accretion of energy and protein in the gravid uterus during late pregnancy in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 78:1954-1954.
- Benefield, B. C., R. A. Patton, M. J. Stevenson, and T. R. Overton. 2009. Evaluation of rumen-protected methionine sources and period length on performance of lactating dairy cows within Latin squares. *Journal of Dairy Science*. 92:4448-4455.
- Broderick, G. A., M. J. Stevenson, R. A. Patton, N. E. Lobos, and J. J. Olmos Colmenero. 2008. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91:1092-1102.
- Broderick, G. A and M. K. Clayton. 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*. 80:2964-2971
- Brown, W. E., and M. S. Allen. 2013. Effects of intrajugular glucose infusion on feed intake, milk yield, and metabolic responses of early post- partum cows fed diets varying in protein and starch concentration. *Journal of Dairy Science*. 96:7132-7142.
- Cabrita, A. R. J., R. J. Dewhurst, D. S. P. Melo, J. M. Moorby, and A. J. M. Fonseca. 2011. Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids

- on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science*. 94:4647-4656.
- Carder, E. G, and W. P. Weiss. 2017. Short- and longer-term effects of feeding increased metabolizable protein with or without an altered amino acid profile to dairy cows immediately post- partum. *Journal of Dairy Science*. 100:4528-4538.
- Chen, X. B, and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom*.
- Chen, Z. H., G. A. Broderick, N. D. Luchini, B. K. Sloan, and E. Devillard. 2011. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy science*. 94:1978-1988.
- Doepel, L., H. Lapierre, and J. J. Kennelly. 2002. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to pre- partum energy and protein intake. *Journal of Dairy Science*. 85:2315-2334.
- Gaines, W. L., H. P. Davis, and R. F. Morgan. 1928. Within-cow regression of milk-energy yield on age and live weight. *Journal of Dairy Science*. 30:273.
- Giallongo, F., A. N. Hristov, Oh, J ., T. Frederick, H. Weeks, J. Werner, H. Lapierre, R. A. Patton, A. Gehman, and C. Parysl. 2015. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98:3292-3308.
- Grummer, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal Animal Science*. 73:2820-2833.

- Hristov, A. N., K. L. Grandeen, J. K. Ropp, and M. A. McGuire. 2004. Effect of sodium laurate on ruminal fermentation and utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87:1820-1831.
- Larsen, M., H. Lapierre, and N. B. Kristensen. 2014. Abomasal protein infusion in post-partum transition dairy cows: Effect on performance and mammary metabolism. *Journal of Dairy Science*. 97:5608-5622.
- Larsen, M., C. Galindo, D. R. Ouellet, G. Maxin, N. B. Kristensen, and H. Lapierre. 2015. Abomasal amino acid infusion in post- partum transition dairy cows: Effect on splanchnic and mammary amino acid metabolism. *Journal of Dairy Science*. 98:7944-7961.
- Law, R. A., F. J. Young, D. C. Patterson, D. J. Kilpatrick, A. R. G. Wylie, and C.S. Mayne. 2009. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. *Journal of Dairy Science*. 92:1001-1012.
- Lee, A. N., T. W. Hristov, K. S. Cassidy, H. Heyler, G. A. Lapierre, M . J. Varga, De Veth, R. A. Patton, and C. Parys. 2012. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of Dairy Science*. 95:6042-6056.
- Lee, C., J. Oh, A.N. Hristov, K. Harvatine, M. Vasquez-Anon, and G.I. Zanton. 2015. Effect of 2-hydroxy-4-methylthio-butanoic acid on ruminal fermentation, bacterial distribution, digestibility and performance of lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 98:1-14.
- Mutsvangwa, T., D. Kiran, and S. Abeysekara. 2016. Effects of feeding canola meal or wheat dried distillers grains with solubles as a major protein source in low- or high-crude protein diets on ruminal fermentation, omasal flow, and production in cows.

- Journal of Dairy Science. 99:1216-1227.
- National Research Council - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washington.
- Ordway, R. S., S. E. Boucher, N. L. Whitehouse, C. G. Schwab, and B. K. Sloan. 2009. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. Journal of Dairy Science. 92:5154-5166.
- Osorio, J. S., P. Ji, J. K. Drackley, D. Luchini, and J. J. Loor. 2013. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. Journal of Dairy Science. 96:6248-6263.
- Osorio, J. S., E. Trevisi, P. Ji, J. K. Drackley, D. Luchini, G. Bertoni, and J. J. Loor. 2014. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk 486 reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. Journal of Dairy Science. 97:7437-7450.
- Overton, T. R., D. W. LaCount, T. M. Cicela, and J. H. Clark. 1996. Evaluation of a 496 ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. Journal of dairy science. 79:631-638.
- Patton, R. A. 2010. 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. 93:2105-2118.
- Schwab, C. G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. Wallace RJ, Chesson A (eds) Biotechnology in animal feeds and animal feeding. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Federal Republic of Germany) and VCH Publishers Inc. 115-141.

- Schwab, C. G., L. D. Satter, and B. Clay. 1976. Response to lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. *Journal of Dairy Science*. 59:1254-1270.
- Socha, M. T., D. E. Putnam, B. D. Garthwaite, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead, C. G. Schwab, G. A. Ducharme, and J. C. Robert. 2005. Improving intestinal amino acid supply of pre- and post- partum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*. 88:1113-1126.
- Tucker W. B., J. F. Hogue, G. D. Adams, M. Aslam, I. S. Shin, and G. Morgan. 1992. Influence of dietary cation-anion balance during the dry period on the occurrence of parturient paresis in cows fed excess calcium. *Journal of Animal Science*. 70:1238-1250.
- Vailati-Riboni, M., Z. Zhou, C. B. Jacometo, A. Minuti, E. Trevisi, D. N. Luchini, and J. J. Loo. 2017. Supplementation with rumen-protected methionine or choline during the transition period influences whole-blood immune response in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100:1-11.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3597.
- Wang, C., Q. Liu, W. Z. Yang, J. Wu, W. W. Zhang, P. Zhang, K. H. Dong, and Y. X. Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt Jr., and T. N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*. 65:495-501.
- Yair, R., and M S. Allen. 2017. Short communication: Short-term intravenous amino acid infusions as a method to detect limiting amino acids in dairy cattle diets. *Journal of Dairy Science*. 100:1-6.

- Zhou, Z., O. Bulgari, M. Vailati-Riboni, E. Trevisi, M. A. Ballou, F. C. Cardoso, D. N. Luchini, and J. J. Loor. 2016a. Rumen-protected methionine compared with rumen protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*. 99:8956-8969.
- Zhou, Z., M. Vailati-Riboni, E. Trevisi, J. K. Drackley, D. N. Luchini, and J. J. Loor. 2016b. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*. 99:8716-8732.

Table 1. Ingredient and nutrient composition of diets (% of DM) low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) during pre- and post- partum.

	Pre- partum			Post- partum		
	LP	HP	HPM	LP	HP	HPM
<i>Ingredient composition</i>						
Corn silage	66.4	66.3	66.3	45.1	45.1	45.1
Oat hay	4.5	4.5	4.5	3.8	3.8	3.8
Soybean meal	8.2			17.9	9.1	9.1
SoypassBR Cargill		13.2	13.2		13.3	13.3
Finely ground mature corn	15.8	10.9	10.8	14.5	14.5	14.5
Whole cottonseeds				8.1	8.1	8.1
Citrus pulp				7.8	3.4	3.3
Urea	0.7	0.7	0.7			
Limestone				0.9	0.9	0.9
Sodium bicarbonate				0.8	0.8	0.8
Magnesium oxide				0.3	0.3	0.3
Salt				0.2	0.2	0.2
Pre- partum premix ¹	4.4	4.4	4.4			
Post- partum premix ²				0.4	0.4	0.4
Mepron			0.09			0.13
<i>Nutrient composition</i>						
CP	13.8	15.6	15.8	16.3	18.4	18.6
NDF	39.3	39.7	39.5	32.4	32.8	32.5
EE	4.1	4.2	4.3	4.6	4.8	4.9
Starch	20.2	20.4	20.4	20.4	20.1	20.1
Ash	10.3	10.5	10.4	8.8	8.8	8.8
NFC	32.5	30.0	29.9	37.9	35.2	35.2

¹210.5 g/kg Ca; 156 g/kg P; 30.4 g/kg Mg; 39.5 g/kg S; 150 mg/kg Co; 2,000 mg/kg Cu; 5,000 mg/kg Mg; 11,903 mg/kg Zn; 82 mg/kg Se; 200 mg/kg I; 1,000 KUI/kg vit A; 220 KUI/kg vit D; 6,200 UI/kg vit E. ²20% Ca; 15.6 % P; 3.5% S; 3.1 % Mg, 100 mg/kg Co; 2,000 mg/kg Cu 120 mg/kg F; 200 mg/kg I; 100 mg/kg Na; 5,000 mg/kg Mn; 12,000 mg/kg Zn; 82 mg/kg Se; 1,000,000 UI/kg vitamin A; 220,000 UI/kg vitamin D; 6,200 UI/kg vitamin E.

Table 2. Weekly energy and protein balances of the diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM), as calculated by the NRC (2001) model¹.

	RDP Balance g/d	RUP Balance g/d	MP Balance g/d	NEI Balance g/d
High				
-21	44	720	553	8.9
-10	46	571	438	6.5
7	122	-136	-111	-3.5
14	141	-94	-79	-2.9
21	142	153	128	0.1
28	113	7	5	-1.8
35	114	-131	-107	-3.6
42	118	-216	-178	-4.6
HighM				
-21	62	770	594	9.5
-10	64	748	576	9.1
7	145	-25	-21	-2.1
14	141	-94	-79	-2.9
21	142	153	128	0.1
28	138	120	101	-0.3
35	145	-148	-124	-3.7
42	148	-61	-51	-2.7
Low				
-21	-29	397	316	6.8
-10	-20	261	208	3.8
7	29	-535	+4	-7.5
14	20	-299	-258	-4
21	19	-250	-216	-3.3
28	18	-240	-207	-3.1
35	13	-271	-234	-3.4
42	14	-273	-236	-3.5

¹ Calculated using treatment averages for DMI, BW, BCS, milk production and composition for each time-point

Table 3. Health incidents low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).

	Diet		
	LP	HP	HPM
Milk fever	0	0	0
Retained placenta ¹	5	3	4
Displaced abomasum	0	0	0
Excluded cows ²	3	2	2
Cows completing the study	13	13	13

¹Defined as fetal membranes retained > 24 h postpartum.

²Number of cows excluded due to failure to recover after prolonged treatment or from death.

Table 4. Feed intake, lactation performance, milk urea-N (MUN), feed efficiency, body weight (BW), body condition score BCS, udder edema and urine pH of allantoin on diets with low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) pre- and post- partum.

	LP	HP	HPM	SEM	<i>P</i> -value ¹		
					Trt	Day	Trt × Day
Pre- partum							
DMI, kg/d	10.4 ^a	11.6 ^{ab}	13.2 ^b	0.66	0.01	< 0.01	0.34
BW, kg	675	663	658	19.7	0.78	0.44	0.88
BCS, 1 to 5	3.33	3.40	3.44	0.12	0.75	0.64	0.80
Urine pH	6.96	7.07	7.12	0.14	0.69		
Post- partum							
DMI, kg/d	16.6	17.5	18.3	0.76	0.27	< 0.01	0.57
Milk, kg/d	31.2	33.7	32.2	0.75	0.12	<0.01	0.78
ECM, kg/d	27.4	28.7	29.1	1.34	0.45	<0.01	0.47
FCM, kg/d	26.7	27.7	27.6	1.29	0.71	<0.01	0.22
Fat, kg/d	0.970	0.937	1.000	0.0640	0.77	<0.01	0.45
Fat, %	3.15	2.92	3.31	0.132	0.12	<0.01	0.79
Protein, kg/d	0.938	0.974	0.967	0.0517	0.82	0.27	0.91
Protein, %	3.24	3.05	3.31	0.145	0.34	<0.01	0.99
Lactose,kg/d	1.335	1.477	1.423	0.0700	0.15	<0.01	0.75
Lactose, %	4.29 ^a	4.40 ^{ab}	4.55 ^b	0.074	0.02	<0.01	0.39
Solids, kg/d	3.486	3.720	3.677	0.1688	0.39	<0.01	0.73
Solids, %	11.60	11.32	12.10	0.236	0.07	<0.01	0.98
Milk/DMI	2.01 ^a	1.96 ^{ab}	1.82 ^b	0.096	0.05	0.98	0.48
ECM/DMI	1.76	1.71	1.66	0.111	0.78	0.38	0.02
FCM/DMI	1.70	1.64	1.58	0.106	0.66	0.07	0.02
MUN, mg/dL	15.7 ^a	19.4 ^b	18.3 ^{bc}	0.90	<0.01	0.68	<0.01
BW, Kg	610	596	593	19.16	0.77	0.58	0.88
BCS, 1 to 5	2.99	2.99	3.05	0.08	0.76	0.62	0.76
Linear SCC, ¹ 1 to 9	3.05	2.83	2.69	0.36	0.76	0.95	0.87
Udder edema, 1 to 4	1.64	1.95	1.55	0.31	0.32	0.49	0.57

¹ Equivalency of the SCC scores. 4.94 = 384,000 cells/mL, 4.17 = 225,000 cells/mL, and 4.37 = 258,000 cells/mL.

Table 5. Serum Insulin (Uu/mL), plasma urea nitrogen (mg/dL), plasma glucose (mg/dL), plasma NEFA (mmol/L), plasma BHBA (mmol/L) and plasma creatinine (mg/dL) concentrations on days, +7, +14 and +21 on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).

													<i>P-value</i>			
	LP	HP	HPM	LP	HP	HPM	LP	HP	HPM	LP	HP	HPM	SEM	Trt	Day	Trt*Day
		± 8			+ 7			+ 14			+ 21					
INSULIN	6.5	6.0	12.9	4.6	3.8	4.9	5.2	5.9	5.9	5.4	8.3	5.6	1.72	0.44	0.02	0.14
PUN	20.7	22.7	22.2	21.0	23.8	23.8	-	-	-	21.6	27.1	25.6	1.36	0.09	< 0.01	0.28
GLUCOSE	70.1	62.5	64.8	60.1	58.5	57.8	56.8	56.8	55.2	58.4	60.0	56.5	2.74	0.67	< 0.01	0.38
NEFA	0.09	0.12	0.11	0.36	0.35	0.33	0.26	0.23	0.30	0.21	0.18	0.21	0.040	0.92	< 0.01	0.74
CREATININE	-	-	-	0.89	1.98	0.93	0.90	0.92	0.90	0.88	2.00	0.78	0.338	0.11	0.30	0.29
BHBA	0.64	0.57	0.56	0.76	0.96	1.28	0.90	1.38	1.30	1.02	1.05	1.43	0.221	0.43	< 0.01	0.43

Table 6. Plasma calcium, interleukin1 (IL- 1), interleukin 10 (IL- 10) and tumor necrosis alpha (TNF α) concentrations on day of calving on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).

	LP	HP	HPM	SEM	Trt
calcium mg/dL	8.57	8.69	8.21	0.46	0.73
IL- 1, pg/mL	376.8 ^a	288.3 ^{ab}	217.9 ^b	43.88	0.05
IL- 10, pg/mL	44.9	44.3	48.8	1190.5	0.99
TNF α , pg/mL	835.9	643.7	735.2	131.75	0.57

Table 7. Hemogram on day + 21 post- partum 12 hours post- morning feeding, on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM).

	LP	HP	HPM	SEM	Trt
Red blood cels mm ³	5.4	5.2	5.2	0.18	0.60
Hemoglobin g/dL	8.9	8.6	8.5	0.25	0.49
Hematocrit %	26.0	25.5	24.9	0.71	0.58
Total Leukocytes mm ³	21.9	15.5	19.3	2.50	0.20
Segmented Leucocytes mm ³	4.2	7.0	4.2	1.28	0.22
Lymphocytes mm ³	17.5 ^a	9.7 ^b	11.2 ^b	2.06	0.03
Monocytes mm ³	0.73	0.66	0.55	0.21	0.81
Eosinophil's mm ³	0.79	0.48	0.32	0.21	0.27
Platelets Thousand/mm ³	244.2	255.4	348.9	41.0	0.15

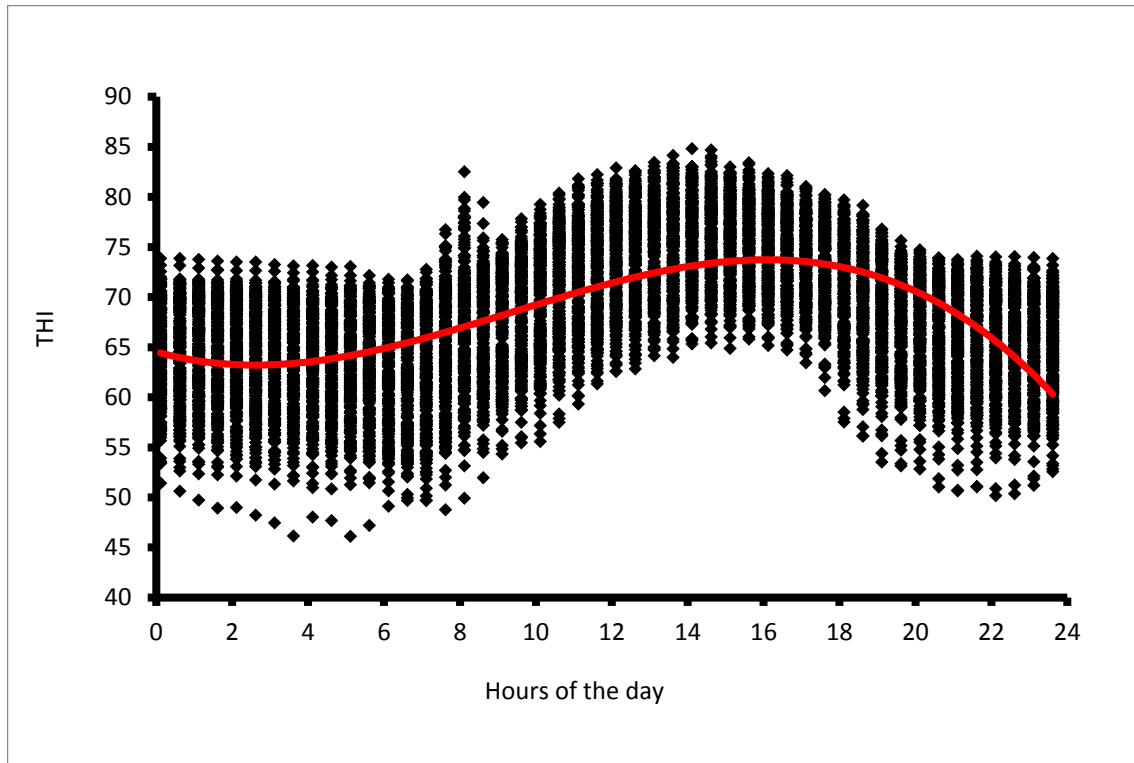


Figure 1. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie- stall during the experimental period. Temperature: 21.0 ± 5.5 °C. Humidity: 78.1 ± 16.0 %. THI: 72.6 ± 6.6 .

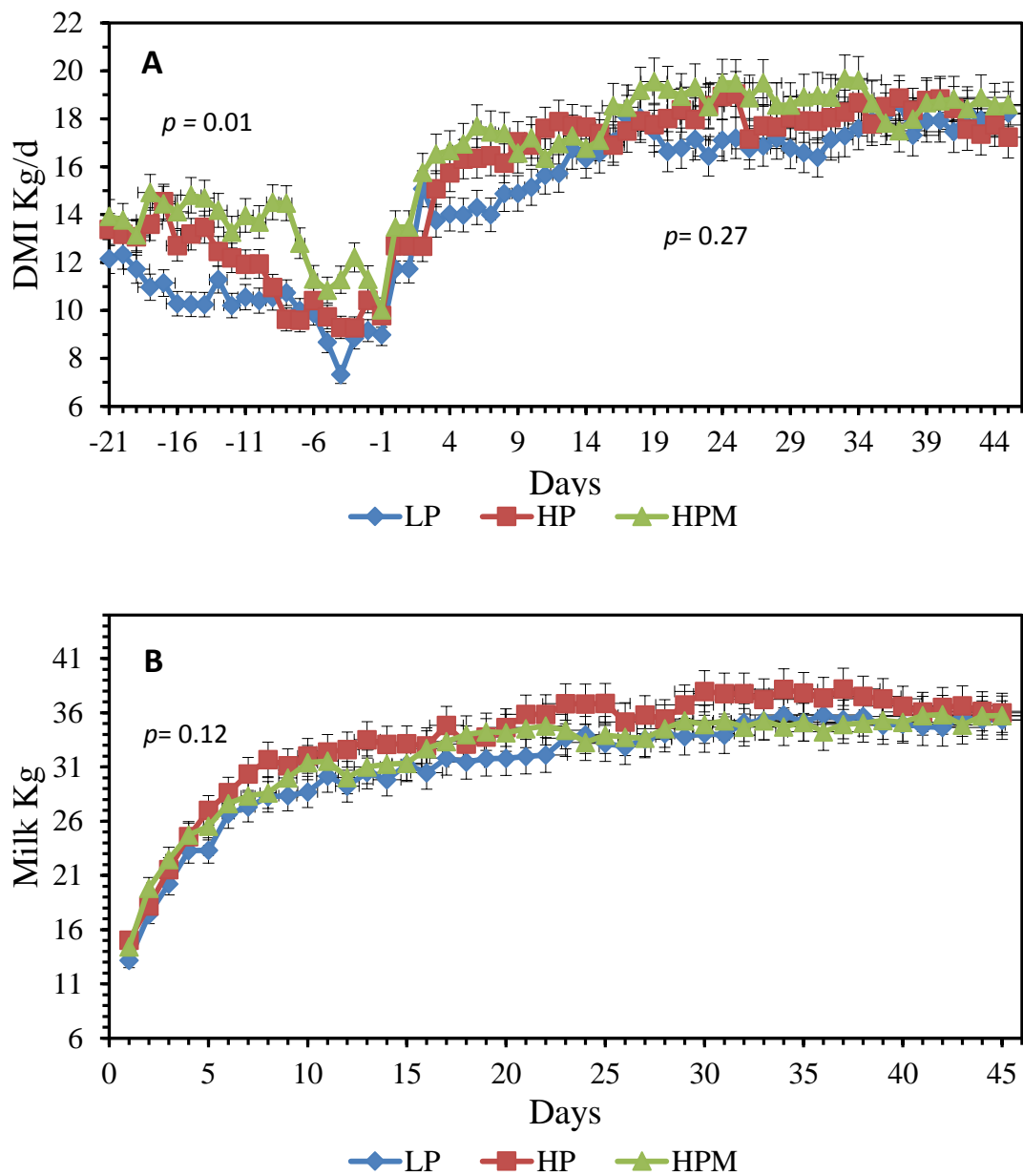


Figure 2. Dry matter intake (DMI) (A) pre- and post- partum, P -values: < 0.01 for treatment, 0.34 for the interaction of treatment and day and DMI post- partum, P -values: 0.27 for treatment, 0.57 for the interaction of treatment and day on diets low protein (LP), high protein (HP), and high protein plus methionine (HPM) and milk yield (B), P -values: 0.12 for diet, 0.78 for the interaction of treatment and day.