



GUSTAVO GONÇALVES BEGALLI

**CONDUÇÃO DE EXPERIMENTO COM VACAS EM
LACTAÇÃO NA UNIVERSIDADE VIRGINIA TECH**

LAVRAS-MG

2022

GUSTAVO GONÇALVES BEGALLI

**CONDUÇÃO DE EXPERIMENTO COM VACAS EM LACTAÇÃO NA
UNIVERSIDADE VIRGINIA TECH**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Zootecnia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2022**

GUSTAVO GONÇALVES BEGALLI

**CONDUÇÃO DE EXPERIMENTO COM VACAS EM LACTAÇÃO NA
UNIVERSIDADE VIRGINIA TECH**

**CONDUCTING THE EXPERIMENT WITH LACTATING COWS AT THE
VIRGINIA TECH UNIVERSITY**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Zootecnia, para a
obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 12 de setembro de 2022.

Marcos Neves Pereira

Ricardo Peixoto de Melo

Junio Fabiano dos Santos

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2022**

RESUMO

Trabalho de conclusão de curso desenvolvido baseado nas atividades realizadas durante estágio na Virginia Tech no estado de Virginia, Estados Unidos da América de março de 2022 a junho de 2022, sob orientação do Professor Doutor Johan Osorio. As atividades relatadas foram realizadas durante uma colaboração em uma pesquisa experimental conduzida pelo laboratório do Professor Doutor Mark Hanigan. Nesse experimento os animais receberam infusão intravenosa de aminoácidos essenciais (Lisina, Metionina, Leucina e Isoleucina) durante 10 dias e acetato marcado durante 24h no décimo dia de infusão dos aminoácidos. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos destes aminoácidos na síntese de ácido graxo (De Novo) no leite. Os dados do experimento ainda estão sendo analisados, portanto resultados não serão relatados neste trabalho.

Palavras-chave: aminoácido, mTOR, gordura do leite, síntese de ácido graxo de novo.

ABSTRACT

Completion of course work developed based on activities carried out during an internship at Virginia Tech in the state of Virginia, United States of America from March 2022 to June 2022, under the guidance of Professor Johan Osorio. The activities reported were carried out during a collaboration on experimental research conducted by the laboratory of Professor Doctor Mark Hanigan. In this experiment, the animals received an intravenous infusion of essential amino acids (Lysine, Methionine, Leucine and Isoleucine) for 10 days and labeled acetate for 24 hours on the tenth day of amino acid infusion. The objective of this work was to evaluate the effects of these amino acids on milk fatty acid synthesis (De Novo). The experiment data are still being analyzed; therefore, results will not be reported in this work.

Key words: amino acid, mTOR, milk fat, de novo fat synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sistema de criação individual de bezerros.....	11
Figura 2 - Galpão de vacas em lactação	12
Figura 3 - Sala de ordenha.....	13
Figura 4 - Laboratório de Pesquisas Metabólicas.....	14
Figura 5 - Animal recebendo infusão	19
Figura 6 - Cronograma do período experimental	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1. Gordura do leite	8
2.2. Síntese de ácidos graxos De Novo	8
2.3. mTOR	9
3. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO	10
3.1. Local do estágio	10
3.2. Instalações	10
3.2.1. Bezerreiro	10
3.2.2. Galpão de Necessidades Especiais	11
3.2.3. Piquetes	11
3.2.4. Galpão de Lactação	12
3.2.5. Ordenha e Centro de Manejo	13
3.2.6. Laboratório de Pesquisas Metabólicas	13
3.2.7. Armazenamento de Alimentos	14
3.2.8. Centro de Tratamento de Dejetos	14
4. EXPERIMENTO	15
4.1. Hipótese	15
4.2. Objetivo	15
4.3. Material e Métodos	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

Durante o estágio foi realizado atividades no acompanhamento de um experimento conduzido pelo grupo do laboratório do Dr. Mark Hanigan, no qual foi estudado os efeitos da infusão de aminoácidos essenciais (AAE) na síntese de gordura do leite.

A gordura do leite é um dos mais importantes componentes do leite, sendo responsável por aspectos sensoriais e nutricionais, podendo modificar a qualidade e rendimento na produção de derivados lácteos, como manteiga, queijo e yogurt por exemplo. Em muitos casos, principalmente nos EUA, a quantidade de gordura no leite influencia diretamente na base de preço do leite. Portanto, o melhor entendimento da síntese de gordura do leite é fundamental, e vem sendo foco de muitas pesquisas.

De modo geral, a composição de gordura no leite por vacas pode ser influenciada por diversos fatores, tais como genética dos animais (Andersson-Eklund e Rendel, 1993; Abdallah e McDaniel, 2000; Stoop et al., 2008), composição e tamanho de partículas da dieta (Bauman e Griinari, 2003; Stoop et al., 2008; Caccamo et al., 2012, Caccamo et al., 2014; McCarthy et al., 2018), estágio da lactação (Stoop et al., 2009), uso de aditivos alimentares (Jensen, 2002; Kozerski et al., 2017).

Segundo Bauman e Griinari (2003) metade dos ácidos graxos (AG) do leite, em vacas, são provenientes de pré-formados, os quais chegam na glândula mamária através da circulação, e a outra metade é sintetizada pela própria glândula mamária, por meio da síntese de ácido graxo De Novo. Os principais substratos para síntese de ácido graxo De Novo são acetato e β -hidroxibutirato (BHBA), em ruminantes (Urrutia e Harvatine, 2017).

Zhao et al (2021) mostrou que no processo de síntese da gordura do leite, o acetato sofre regulação pela via de sinalização de *mammalian target of rapamycin/eukaryotic initiation factor 4E* (mTOR/eIF4E). mTOR é um regulador essencial no crescimento celular e metabolismo, através da modulação da síntese de proteína e lipídeo (Takahara et al., 2020). A ativação de mTOR é influenciada pela disponibilidade de aminoácidos (Burgos et al., 2010).

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Gordura do leite

A gordura do leite é o principal componente de energia do leite, sua importância também está relacionada com aspectos nutricionais e de sabor (Zhao et al., 2020). Na maior parte dos EUA o preço pago pelo leite aos produtores possui uma bonificação para conteúdo de gordura (Jenkins e McGuire, 2006). Em vacas leiteiras a concentração de gordura é de aproximadamente 3-5% do leite (Givens e Shingfield, 2006). Mais de 400 ácidos graxos compõe a gordura do leite, porém apenas 14 deles estão presentes em concentração maior do que 1g/100g (Jensen, 2002).

Diversos fatores podem interferir na composição de ácidos graxos do leite. Em um estudo realizado por Soyeurt et al. (2006), foi relatado diferenças no conteúdo e composição dos ácidos graxos entre animais de diferentes raças, evidenciando a influência do fator genético. Animais alimentados com dietas altamente fermentáveis podem apresentar casos de depressão de gordura do leite, em decorrência de mudanças na fermentação ruminal (Harvatine, Boisclair e Bauman, 2009). Stoop et al. (2009) analisou dados de 1933 vacas em 398 fazendas comerciais, onde a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) aumentou durante os 3 primeiros meses de lactação e após isso começou a cair, o inverso aconteceu com ácidos graxos de cadeia longa (AGCL).

Ácidos graxos presentes no leite podem ser classificados quanto a sua origem. Ácidos graxos de síntese De Novo (C4 a C14) são sintetizados primariamente pelas células epiteliais da glândula mamária, o C16 é sintetizado e derivado de suprimentos de sangue, chamado de misto, e os pré-formados (formados por 18 ou mais carbonos) são derivados exclusivamente de sangue (Palmquist, 2006).

1.2. Síntese de ácidos graxos De Novo

Na síntese de AG De novo, acetato e BHBA são importados para o interior das células do epitélio da glândula mamaria e usados como fonte de carbono, onde são incorporados com triacilglicerol (TAG) através de proteínas, e liberados no leite (Bauman e Davis, 1974). Estratégias nutricionais com capacidade de otimizar a produção de acetato no rúmen podem aumentar a quantidade de gordura no leite através da síntese de ácido graxo De Novo (Urrutia

e Harvatine, 2017). Vacas alimentadas com acetato de sódio aumentaram a produção de gordura no leite em 90 gramas por dia (Urrutia et al., 2019).

SREBP1 é um precursor inativo sintetizado no retículo endoplasmático, o qual ativa um gene adipogênico após começar a ser hidrolisado no complexo de Golgi (Young-Ah, 2017). O gene desse precursor é um fator importante na regulação da síntese de ácido graxo De Novo (Salter e Tarling, 2007). No trabalho de Zhao et al. (2021) quando aumentou a concentração de acetato, a expressão de gene do SREBP1 foi aumentada, e a via de sinalização de mTOR foi ativada, revelando que o acetato regula a síntese de AG no leite através da via de sinalização mTOR nas células do epitélio da glândula mamaria.

Sumarizando, além de ser utilizado como substrato, o acetato também desempenha uma importante função como regulador positivo na síntese de gordura do leite (Mu et al., 2021).

1.3. mTOR

Em células de mamíferos, o mTOR forma pelo menos dois complexos estruturalmente distintos, o mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTORC2, a fim de exercer suas funções. mTORC1 consiste em mTOR, a proteína associada regulatória de mTOR (Raptor), e homólogo de LST8 de mamífero (mLst8) como componentes principais. Por outro lado, o mTORC2 contém mTOR, a rapamicina insensível associada mTOR (Rictor), e mLST8, como componentes principais. Ambos mTORC1 e mTORC2 atuam como dímeros (Takahara et al., 2006, Yip et al., 2010).

O mTORC1 regula o crescimento e o metabolismo celular modulando síntese de proteínas, lipídios e purinas, bem como biogênese de lisossomo e autofagia. A atividade do mTORC1 é influenciada por uma variedade de sinais, como amino ácidos, glicose, fatores de crescimento, níveis de energia e estresse (Wullschleger et al., 2006, Sengupta et al., 2010, Shimobayashi e Hall, 2014). Uma das principais funções do mTORC1 é a promoção do anabolismo (Takahara et al., 2020). Além disso, mTORC1 promove a síntese de lipídeos pela fosforização da lipina 1, desse modo a atividade do SREBP1 é aumentada (Peterson et al., 2011).

Diversos trabalhos relataram alterações na ativação de mTOR quando animais receberam infusão de aminoácidos essenciais, levando a alterações na produção e composição do leite. Diminuição na via de ativação de mTOR foram observadas quando Leucina e Isoleucina

estavam deficientes em estudos in vitro e alguns in vivo (Arriola Apelo et al., 2014b; Doelman et al., 2015b; Liu et al., 2017). O mecanismo de ativação de mTOR por Lisina ou Histidina parece ser menos potente ou inexistente quando comparado com Isoleucina e Leucina (Appuhamy et al., 2012).

2. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO

2.1. Local do estágio

As atividades ocorreram no complexo de bovinos leiteiros da Virginia Tech, o qual fica situado na Fazenda Kentland. A fazenda é propriedade da universidade e conta com 728 hectares, onde são desenvolvidas atividades de ensino, pesquisa e extensão. O complexo fica localizado na área rural de Blacksburg, à 16Km do Campus principal da Virginia Tech.

O número total de animais do rebanho é de aproximadamente 516 animais, das raças Holandesa preto e branco e Jersey, na tabela 1 está apresentado o número de animais por categoria.

Tabela 1 - Composição do rebanho em 2022

GRUPO	HOLANDES P&B	JERSEY	TOTAL
BEZERRAS E NOVILHAS	190	38	228
VACAS SECAS	30	12	42
VACAS EM LACTAÇÃO	199	47	246
TOTAL	419	97	516

2.2. Instalações

2.2.1. Bezerreiro

O bezerreiro da fazenda é composto por casinhas individuais (AGRI-PLASTICS calf hutches), onde os animais ficam alojados até os 21 dias de vida, e baias coletivas equipadas com alimentador automático (DeLaval calf feeder CF1000S).

Figura 1- Sistema de criação individual de bezerras



Fonte: Do autor, (2022).

2.2.2. Galpão de Necessidades Especiais

Metade deste galpão é dividido entre animais na fase de transição (pré- e pós-parto), podendo ser subdividido em até 6 lotes. Nessa área utiliza-se o sistema de cama sobreposta, e a reposição era realizada uma vez por semana. Nesta parte do galpão possui 18 cochos individuais (American Calan Gates) destinados a pesquisa.

Na outra metade do galpão possui dois lotes de free stall com camas duplas para criação de bezerras desmamadas até estarem aptas a serem inseminadas; oito baias individuais destinadas a maternidade e hospital; e três troncos de contenção para manejo dos animais.

2.2.3. Piquetes

As novilhas inseminadas e vacas secas são criadas em uma área de piquetes, e permanecem lá até aproximadamente 21 dias antes da data prevista para o parto. Embora esses animais

tenham acesso ao pastejo, eles recebem TMR para suprir as necessidades nutricionais. Na área central dos piquetes há um centro de manejo com tronco de contenção e baias.

2.2.4. Galpão de Lactação

Instalação do tipo Free stall com 240 camas dupla, compostas de areia, onde os animais são alojados durante o período de lactação. Uma vez por semana é realizada a reposição de areia nas camas. A limpeza dos corredores é através de um sistema de flush, com água reutilizável. O galpão é equipado com 48 cochos individuais (American Calan Gates) utilizados para mensurar o consumo individual em pesquisa, e ventiladores para auxiliar no resfriamento dos animais.

Figura 2 - Galpão de vacas em lactação



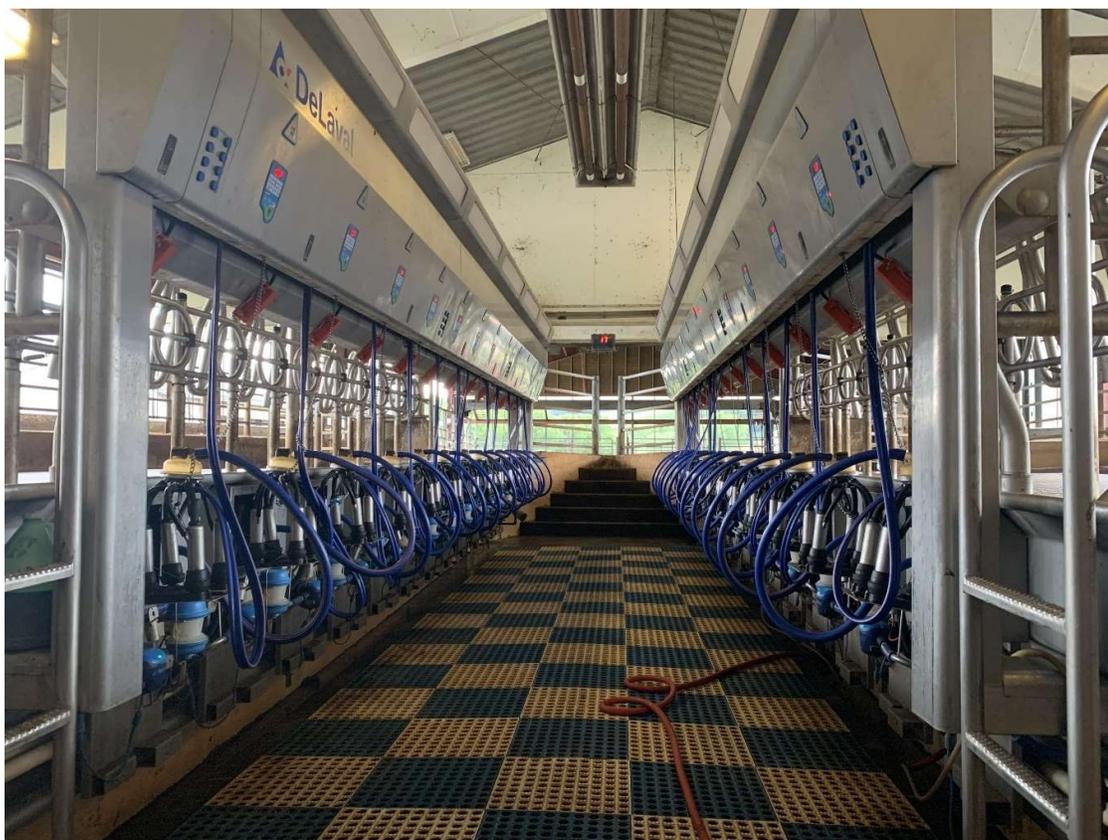
Fonte: Do autor, (2022).

2.2.5. Ordenha e Centro de Manejo

A sala de espera para ordenha possui puxador automático e ventiladores. O sistema de ordenha é um duplo doze de saída rápida (DeLaval) equipada com extratores automático e medidores eletrônicos (Afimilk), os quais mensuram produção de leite, porcentagem de gordura, porcentagem de proteína, porcentagem de lactose e condutividade individual.

Na saída da ordenha está localizado o centro de manejo, composto por um tronco de contenção coletivo, um tronco de contenção individual, uma balança automática (todos os animais são pesados ao saírem da ordenha) e um portão separador automático.

Figura 3 - Sala de ordenha



Fonte: Do autor, (2022).

2.2.6. Laboratório de Pesquisas Metabólicas

Possui quatro salas para alojar os animais, cada sala possui 6 camas do sistema tie-stall. As salas possuem controle de umidade e temperatura, drenagem para dejetos, sistema de vácuo possibilitando a ordenha dos animais no local. Além disso o prédio possui um

laboratório de necrópsia, um laboratório biológico, uma sala de autoclave, lavanderia, vestiários e sanitários.

Figura 4 - Laboratório de Pesquisas Metabólicas



Fonte: Do autor, (2022).

2.2.7. Armazenamento de Alimentos

A fazenda utiliza silos do tipo bag e vertical, destinados para o armazenamento de forragens úmidas (silagem de milho e culturas temperadas) e concentrados, respectivamente, um galpão dividido em grandes boxes onde são armazenados os fenos.

2.2.8. Centro de Tratamento de Dejetos

Destino de todos os dejetos e resíduos de água do complexo. Possui reservatórios de dejetos, rampa de decantação de areia, e uma pista para secagem da areia. Após a separação, a parte sólida dos dejetos é transferida para uma área de compostagem, e a parte sólida fica

armazenadas em tanques. Estes dejetos são utilizados como fertilizantes nas lavouras da fazenda e a areia é reutilizada na cama dos animais.

3. EXPERIMENTO

3.1. Hipótese

Em um estudo *in vitro* realizado pelo laboratório do Dr. Hanigan previamente (dados não publicados), foi testado qual a influência de cada aminoácido essencial individualmente na síntese de ácidos graxos pelas células epiteliais da glândula mamaria, em nível fisiológico. Foram aplicados 12 tratamentos: Um controle positivo, simulando os níveis fisiológicos da concentração dos aminoácidos essenciais; um controle negativo, onde todos os 10 aminoácidos essenciais foram omitidos; e outros 10 tratamentos, onde em cada era omitido um dos aminoácidos essenciais e mantinha-se as concentrações dos demais como no controle positivo. Foi observado um maior impacto na síntese de gordura no leite quando Isoleucina, Leucina, Lisina e Metionina foram removidos do tratamento.

Com base nesses resultados surgiu a hipótese de que esses aminoácidos estariam mais fortemente ligados ao mecanismo de síntese de ácido graxo pela glândula mamária.

3.2. Objetivo

O objetivo do atual estudo realizado foi entender a relação entre os aminoácidos, que apresentaram maior efeito no estudo *in vitro*, na síntese de gordura na glândula mamaria, em um experimento *in vivo*. Para isso, ^{13}C acetato marcado (U- ^{13}C , 97-99% enriquecido, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) foi utilizado como um marcador da síntese de ácido graxo no leite.

3.3. Material e Métodos

O experimento foi realizado na fazenda experimental da Virginia Tech, no Laboratório de Pesquisas Metabólicas, entre abril e junho de 2022. Foram utilizadas 12 vacas da raça holandesa em segunda lactação, entre 60 e 150 dias em lactação. Os animais foram blocados por Dias em Lactação e atribuído aleatoriamente para 1 de 2 grupos. Cada grupo teve seqüências de tratamento dentro de um arranjo fatorial 2 x 2 em 2 quadrados latinos incompletos (quadrado de Youden) 4 x 3 replicados ortogonalmente, com 4 períodos e 3 vacas em cada um (Tabela 2). Cada período teve duração de 14 dias, e os tratamentos testados

foram: Controle (CON), Metionina (M), Lisina (K), Metionina + Lisina (MK), Isoleucina (I), Leucina (L), e Isoleucina + Leucina (IL).

Tabela 2 - Distribuição dos tratamentos

	GRUPO 1						GRUPO 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Período 1	C	MK	M	K	C	M	C	IL	L	IL	C	I
Período 2	K	M	MK	MK	M	K	L	C	I	I	IL	L
Período 3	M	C	K	C	K	MK	I	L	IL	L	I	C
Período 4	MK	K	C	M	MK	C	IL	I	C	C	L	IL

Antes do início do período experimental foi realizado uma transição adaptativa da dieta da fazenda para a dieta experimental. Os 12 animais foram alocados em um curral no free-stall, onde receberam no primeiro dia 75% dieta da fazenda e 25% de dieta experimental, no segundo dia 50% de dieta da fazenda e 50 % de dieta experimental, no terceiro dia 25% de dieta da fazenda e 75% de dieta experimental, e no quarto dia os animais foram movidos para o laboratório de pesquisas metabólicas, onde foram alojados em duas salas contendo 6 camas de Tie-stall em cada.

Entre o término de um período e início de outro era realizado um período de limpeza com duração de 3 dias. Durante este período os 12 animais eram movidos para um curral no Free-stall, e mensurava-se o consumo diário do grupo, o qual foi usado para estimar o consumo individual para o próximo período experimental. Ao serem movidos para o laboratório de pesquisas metabólicas o consumo era monitorado individualmente, e o primeiro dia foi usado para aclimação dos animais.

Foi utilizado uma mesma dieta (Tabela 3 e 4) para todos os animais durante todos os períodos, formulada para atender os requerimentos de energia, proteína degradável no rúmen, minerais e vitaminas, mas para ser deficiente (85% do requerimento) em proteína metabolizável para uma vaca holandesa com 700 quilogramas de peso corporal, produzindo 49 quilogramas de leite contendo 3,60% de gordura e 3,15% de proteína verdadeira, baseado nos requerimentos do NASEM 2021. Para se minimizar o erro durante a mistura da dieta, a maioria dos ingredientes concentrados (exceto os aminoácidos protegidos, Smartamine M e Smartamine ML) eram fornecidos como uma ração peletizada.

Os animais receberam TMR ad libitum uma vez por dia, às 12:00PM, a qual foi misturada e distribuída utilizando um *Data Ranger (American Calan)*. A ordem de inclusão

dos ingredientes para mistura seguia o seguinte padrão: forragens, ração peletizada e aminoácidos protegidos. Os aminoácidos protegidos eram pesados em uma balança de precisão, e incluídos no *Data Ranger* logo após iniciar a mistura da dieta. O tempo e velocidade de mistura também eram controlados de forma padronizada para não afetar as características físicas da dieta. Ao longo do dia a dieta era mexida nos cochos frequentemente, para estimular o consumo pelos animais. A quantidade ofertada e as sobras eram pesadas usando a mesma balança, esses dados foram anotados diariamente e a quantidade ofertada era ajustada para se obter 5% de sobras. A matéria seca dos ingredientes era aferida para se ajustar a quantidade de matéria natural utilizada na batida toda semana, esse procedimento era rotina da fazenda e realizado pelos funcionários.

Tabela 3 - Composição de ingredientes da Dieta

INGREDIENTE	% MS
Silagem de Milho	36,45
Feno de Gramínea	6,53
Grão de milho seco ¹	16,76
Polpa cítrica ¹	8,87
Casca de soja ¹	8,09
Farelo de Soja (48) ¹	13,15
Farelo de Glúten de Milho ¹	0,51
DDG ¹	1,91
Farinha de Sangue ¹	0,51
Megalac ¹	1,53
Energy Booster 100 ¹	1,53
Bicarbonato de Sódio ¹	1,32
Calcário ¹	1,32
Zinpro Availa 4 ¹	0,010
Volclay ¹	0,204
Vit ADE premix ExMill ¹	0,051
Vit E premix ExMill ¹	0,051
Ultrasorb ¹	0,020
TraceMin ExMill ¹	0,010
Levedura Selênizada ExMill ¹	0,071
Sulfato de Zinco ¹	0,010
Sulfato de Sódio ¹	0,530
Fosfato de Cálcio ¹	0,408
Iodato de Cálcio ¹	0,0001
Smartamine M	0,054
Smartamine ML	0,100

¹ - Componentes da ração peletizada.

Semanalmente uma amostra dos alimentos foi coletada, pré-secada em uma estufa a 55°C por 72 horas. Ao final de cada período foi realizado uma composta destas amostras, e armazenada congelada a -20°C, para ser analisada posteriormente.

Tabela 4 – Composição de nutrientes da dieta formulada

NUTRIENTE	QUANTIDADE
Matéria Seca, %	53,9
Fragem, % da MS	43,0
Proteína Bruta, % da MS	15,2
Energia Metabolizável, Mcal/Kg	2,75
Proteína Metabolizável, % da MS	9,06
Energia Líquida para Lactação, Mcal/Kg	1,81
Proteína não degradável no Rúmen, % da MS	5,2
Proteína degradável no Rúmen, % da MS	10,0
Digestibilidade da Proteína degradável no Rúmen, % da MS	4,2
FDA, % da MS	16,5
FDN, %MS	30,8
FDA/FDN, Taxa	0,54
FDN de Forragem, %MS	19,5
Amido, %MS	24,4
Cinzas, %MS	7,9
AG Total, %MS	4,83
Ca, %MS	0,92
P, %MS	0,40
Mg, %MS	0,22
K, %MS	1,00
NA, %MS	0,52
Cl, %MS	0,12
S, %MS	0,22
DCAD, mEq/Kg	311

No dia anterior ao início da infusão de aminoácidos era realizada a cirurgia para implantação de cateteres. Eram implantados dois cateteres (90 cm x 2.03 mm i.d. microrenathane, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) no mesmo lado do pescoço de cada animal, um deles(inferior) destinado para infusão, e o outro (superior) para coleta de amostras de sangue. A cada período se alternava o lado de implantação de cateteres, a fim de evitar infecções e hematomas. Após a cirurgia o pescoço dos animais era envolvido com manta elástica para manter a região limpa e protegida. Diariamente era realizada checagem do status de saúde dos animais (temperatura retal, frequência respiratória e ruminação) e situação dos cateteres.

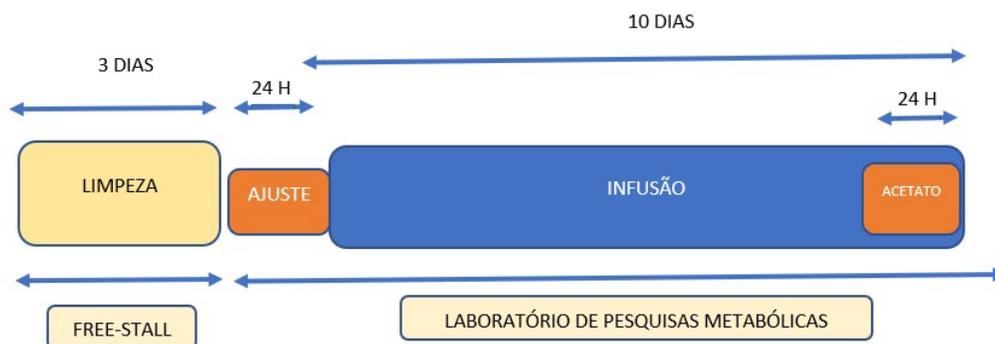
Figura 5 - Animal recebendo infusão



Fonte: Do autor, (2022).

Durante 10 dias os animais recebiam infusão de aminoácido respectiva a cada tratamento, e durante 24 horas, no décimo quarto dia de cada período era realizado a infusão de acetato. A infusão foi realizada utilizando uma bomba de infusão com fluxo programado (RF-5000, Abbott Lifecare, San Antonio, TX). Para cada animal foi utilizado uma bomba, e durante a infusão de acetato foi adicionado uma segunda bomba.

Figura 6 - Cronograma do período experimental



Fonte: Do autor (2022).

Os tratamentos (aminoácidos) foram solubilizados em solução salina armazenada em bolsas esterilizadas. A taxa de infusão(ml/minutos) era fixa, calculada por tratamento, de modo que atendesse a quantidade diária de aminoácido de cada tratamento. A quantidade de aminoácido infundida diariamente foi equivalente a 20% da quantidade ofertada pela dieta experimental (Isoleucina: 28,6g/d; Leucina: 41g/d; Lisina: 37,6g/d; Metionina: 12g/d).

Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia (01:00AM e 12:00PM), junto com o restante do rebanho da fazenda. Para isso, era realizada uma pausa na infusão de aminoácido aproximadamente 15 minutos antes de cada ordenha, em seguida injetava 2ml de heparina 20uL via cateter a fim de evitar coagulação do sangue e entupimento do cateter, e os animais eram movidos até a ordenha da fazenda. Quando os animais retornavam para o laboratório de pesquisas metabólicas, retirava-se uma alíquota de 3ml pelo cateter, com isso a heparina era removida e a infusão era retomada. Esse processo de pausa na infusão tinha uma duração média de 2 horas por dia. Durante as 24 horas de infusão do acetato os animais foram ordenhados na própria cama, e a infusão não foi pausada, seguindo a mesma frequência e horário de rotina, utilizando sistema de ordenha balde ao pé, com latões individuais, que eram ligados ao sistema de vácuo da instalação.

A produção de leite foi recordada diariamente em cada ordenha, e no décimo dia de cada período experimental foi coletado três amostras de leite em cada ordenha. Uma amostra contendo conservante(bronopol) era resfriada a 4°C e enviada para análise de gordura, proteína, lactose, contagem de células somáticas e nitrogênio ureico no leite (United DHIA, Radford/VA); outras duas amostras foram coletadas em tubos de 50ml, uma delas era centrifugada por 10 minutos a uma velocidade de 2000 x g em temperatura ambiente, para a suspensão da gordura do leite, e coletava-se duas amostras (2ml cada) de gordura para análise do perfil de ácido graxo do leite; a outra amostra de leite foi armazenada congelada a -20°C sem conservantes para futuras análises.

No décimo dia experimental também foram coletadas amostras de sangue, um total de 12 amostras por animal, nos seguintes pontos de tempo: -30min, -15min, 0h, +30min, +3h, +6h, +9h, +12h, +15h, +18h, +21h e +24h, em relação ao horário de início da infusão de acetato. Para a amostragem, primeiramente ejetava aproximadamente 3ml em uma seringa cirúrgica, via cateter, e descartava devido a presença da heparina contida no cateter; em seguida coletava uma outra amostra de 5ml, usada para análise. Ao final de cada tempo de coleta, os tubos eram centrifugados por 15 minutos, a 1600 x g, em temperatura ambiente.

Duas amostras (2ml cada) de plasma eram armazenadas congeladas a -20°C , para realizar análises de concentração de acetato futuramente.

Uma vaca foi diagnosticada com mastite clínica durante o segundo período e os dados dela no segundo período serão descartados. Os dados serão analisados com um modelo misto usando o “lmer” pacote no R (versão 3,4,3; R core Team, 2017). Produção de leite, composição do leite, e Consumo de matéria seca dos tratamentos serão analisados por período experimental. O seguinte modelo será utilizado para análise dos dados:

$$Y_{ijklm} = \mu + I_i + L_j + I * L_{ij} + Bloco_k + Período_L + Vaca(Bloco)_{m(k)} + e_{ijklm}$$

onde Y_{ijklm} = variável dependente, μ = média da população de Y, I_i = efeito fixo da infusão de isoleucina no grupo 1 ou infusão de metionina no grupo 2, L_j = efeito fixo da infusão de leucina no grupo 1 ou infusão de lisina no grupo 2, $I * L_{ij}$ = interação de I_i e L_j , $Bloco_k$ = efeito padrão de bloco, $Período_L$ = efeito padrão de período, e $Vaca(Bloco)_{m(k)}$ = efeito padrão de vaca aninhada dentro do bloco. Efeitos e interações serão declarados significantes para $P \leq 0.05$ e tendências para $P \leq 0.10$.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas como esta acompanhada durante o estágio supervisionado são extremamente importantes para o entendimento melhor dos processos ligados a produção de leite e seus componentes. De modo que sejam geradas novas estratégias e conhecimentos que possibilitam a otimização da produção de leite.

A realização do estágio supervisionado em uma universidade em outro país é um experiencia ímpar. Possibilitando o conhecimento de novas culturas, ampliação da rede de contatos, além de contribuir fortemente com o desenvolvimento pessoal e profissional do aluno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, J. M., B. T. MCDANIEL. **Genetic change in milk, fat, days open, and body weight after calving based on three methods of sire selection.** Journal of Dairy Science. v 83, p. 1359–1363, 2000.

ANDERSSON-EKLUND, L., J. RENDEL. **Linkage between amylase-1 locus and a major gene for milk fat content in cattle.** Animal Genetics. v. 24. p. 101–103, 1993.

APPUHAMY, J. A., N. A. KNOEBEL, W. A. NAYANANJALIE, J. ESCOBAR, AND M. D. HANIGAN. **Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices.** J. Nutr. V. 142 p. 484–491, 2012.

ARRIOLA APELO, S. I., L. M. SINGER, X. Y. LIN, M. L. MCGILLIARD, N. R. ST-PIERRE, M. D. HANIGAN. **Isoleucine, leucine, methionine, and threonine effects on mammalian target of rapamycin signaling in mammary tissue.** Journal of Dairy Science. v. 97 p. 1047–1056, 2014.

BAUMAN D. E., DAVIS C. L. **Biosynthesis of milk fat. In Lactation: A Comprehensive Treatise**, v. 2. p. 31–75 (Eds BL Larson & VR Smith). Academic Press, NY, USA, 1974.

BAUMAN, D. E., J. M. GRIINARI. **Nutritional regulation of milk fat synthesis.** Annual Review of Nutrition v. 23 p. 203–227, 2003.

BURGOS, SA, DAI, M CANT, JP. **Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway.** Journal of Dairy Science v. 93 p. 153-161, 2010.

CACCAMO, M., J. D. FERGUSON, R. F. VEERKAMP, I. SCHADT, R. PETRIGLIERI, G. AZZARO, A. POZZEBON, G. LICITRA. **Association of total mixed ration particle fractions retained on the Penn State Particle Separator with milk, fat, and protein yield lactation curves at the cow level.** Journal of Dairy Science. v. 97 p. 2502–2511, 2014.

CACCAMO, M., R. F. VEERKAMP, G. LICITRA, R. PETRIGLIERI, F. LA TERRA, A. POZZEBON, J. D. FERGUSON. **Association of total-mixedration chemical composition**

with milk, fat, and protein yield lactation curves at the individual level. *Journal of Dairy Science*. v. 95 p. 6171–6183, 2012.

DOELMAN, J., J. J. KIM, M. CARSON, J. A. METCALF, J. P. CANT.. **Branched-chain amino acid and lysine deficiencies exert different effects on mammary translational regulation.** *Journal of Dairy Science*. v. 98 p. 7846–7855, 2015.

GIVENS, D. I., SHINGFIELD, K. J. **Optimising dairy milk fatty acid composition.** In C. Williams & J. Buttriss (Eds.), *Improving the Fat Content of Foods* (p. 252–280). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2006.

HARVATINE, K. J., Y. R. BOISCLAIR, D. E. BAUMAN. **Recent advances in the regulation of milk fat synthesis.** *Journal of Animal Science*. v. 3, p. 40-54, 2009.

JENKINS, TC E MCGUIRE, MA. **Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition.** *Journal of Dairy Science* v. 89 p. 1302-1310, 2006.

JENSEN, RG. **Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000.** *Journal of Dairy Science*. v. 85 p. 295–350, 2002.

LIU, G. M., M. D. HANIGAN, X. Y. LIN, K. ZHAO, F. G. JIANG, R. R. WHITE, Y. WANG, Z. Y. HU, Z. H. WANG. **Methionine, leucine, isoleucine, or threonine effects on mammary cell signaling and pup growth in lactating mice.** *Journal of Dairy Science*. v. 100 p. 4038–4050, 2017.

MCCARTHY, M. M., T. R. OVERTON, G. D. MECHOR, D. E. BAUMAN, T. C. JENKINS, D. V. NYDAM. **Short communication: Field study to investigate the associations between herd-level risk factors for milk fat depression and bulk tank milk fat percent in dairy herds feeding monensin.** *Journal of Dairy Science*. v. 101 p. 3118–3125, 2018.

PALMQUIST, D. L. **Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon.** Pages 43–92 in *Advanced Dairy Chemistry*. Vol. 2: Lipids. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. Springer, 2006.

PETERSON T. R., SENGUPTA S. S., HARRIS T. E., CARMACK A. E., KANG S. A., BALDERAS E., et al. **mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway.** *Cell.* v. 146 p. 408–420, 2011.

SALTER, A. M., E. J. TARLING. **Regulation of gene transcription by fatty acids.** *Journal of Animal Science.* v. 1 p. 1314–1320, 2007.

SENGUPTA S., PETERSON T. R., SABATINI D. M. **Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress.** *Molecular Cell.*; v. 40 p. 310–322, 2010.

SHIMOBAYASHI M., HALL M. N. **Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk.** *Nature Reviews Molecular cell biology.* v. 5 p.155–162, 2014.

SOYEURT, H., P. DARDENNE, A. GILLON, C. CROQUET, S. VANDERICK, P. MAYERES, C. BERTOZZI, N. GENGLER. **Variation in Fatty Acid Contents of Milk and Milk Fat Within and Across Breeds.** *Journal of Dairy Science* v. 89 p. 4858–4865, 2006.

STOOP, W. M., H. BOVENHUIS, J. M. L. HECK, J. A. M. VAN ARENDONK. **Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows.** *Journal of Dairy Science.* v. 92 p. 1469–1478, 2009.

STOOP, W. M., J. A. M. VAN ARENDONK, J. M. L. HECK, H. J. F. VAN VALENBERG, H. BOVENHUIS. **Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein Friesians.** *Journal of Dairy Science.* v. 91 p. 385–394, 2008.

TAKAHARA ET AL., **Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes.** *Journal of Biomed Science* v. 27, p. 87, 2020.

TAKAHARA T, HARA K, YONEZAWA K, SORIMACHI H, MAEDA T. **Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N terminal HEAT repeat region.** *Journal of Biological and Chemistry.* V. 281 p. 28605-28614, 2006.

URRUTIA N. L., HARVATINE K. J. **Effect of conjugated linoleic acid and acetate on milk fat synthesis and adipose lipogenesis in lactating dairy cows.** *Journal of Dairy Science.* v. 100 p. 1–13, 2017.

URRUTIA, N., R. BOMBERGER, C. MATAMOROS, K. J. HARVATINE. **Effect of dietary supplementation of sodium acetate and calcium butyrate on milk fat synthesis in lactating dairy cows.** Journal of Dairy Science. V. 102 p. 5172–5181, 2019.

WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, HALL M. N. **TOR signaling in growth and metabolism.** Cell.; v. 124 p. 471–484, 2006.

YIP C.K., MURATA K., WALZ T., SABATINI D. M, KANG S. A. **Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition.** Molecular Cell. v. 38 p.768–774, 2010.

YOUNG-AH M. **The SCAP/SREBP pathway: a mediator of hepatic steatosis.** Journal of Endocrinology and Metabolism. V. 32 p. 6–10, 2017.

ZHAO YL, GUO XY, YAN SM, SHI BL, SHENG R. **Acetate regulates milk fat synthesis through the mammalian target of rapamycin/eukaryotic initiation factor 4E signaling pathway in bovine mammary epithelial cells.** Journal of Dairy Science. v. 104 p. 37–45,2021.