

LARISSA JOSÉ PARAZZI

**Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de
marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie**

Pirassununga, SP

2014

LARISSA JOSÉ PARAZZI

**Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de
marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga-SP

2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2998
FMVZ

Parazzi, Larissa José

Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie / Larissa José Parazzi. -- 2014.
133 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti.

1. Glutamina. 2. Marrãs. 3. Gestação. 4. Ovulação. 5. Lactação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie", protocolado sob o nº 2618/2012, utilizando 50 (cinquenta) suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/5/2012.

We certify that the Research "Effects of sow dietary L-glutamine and L-glutamic acid supplementation on reproductive and productive performance of progeny", protocol number 2618/2012, utilizing 50 (fifty) swine, under the responsibility Prof. Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/16/2012.

São Paulo, 8 de maio de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PARAZZI, Larissa José

Título: Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Augusto e Beth, meu irmão Guto, meu namorado Marcos e meus avós que estão olhando por mim, que sempre estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos, me proporcionando conquistar esse sonho.

Amo vocês incondicionalmente!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, ao Divino Pai Eterno, Nossa Senhora Aparecida e Santo Expedito por tudo!!! Pelas graças pedidas e alcançadas!!!!

Agradeço a minha família, meus pais Beth e Augusto, meu irmão Guto e Milena, que me apoiaram em tudo sempre, fazendo o possível e impossível para a realização dos meus sonhos, com muita paciência!!!! Ao Toninho, que esteve sempre, sempre, sempre presente e pronto pra ajudar com minhas porquinhas e seus leitõezinhos, me dando muito apoio!!! Amo vocês!

Agradeço aos amigos e tios de coração, Gilson e Sônia, Airton e Teresa, Celso e Dirce, pela verdadeira amizade!

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (processo 2011/15020-1).

À Ajinomoto Animal Nutrition pela participação e colaboração na pesquisa.

Claro, às meninas de casa pela amizade, confiança, risadas, pela ajuda, por tudo! Formamos uma família à parte em Pira, Ju Diniz, Ju Mega e Milena, vocês moram no meu coração! E a casa não seria casa, se não tivéssemos as calopsitas Piriquita e Heineken, além de Belinha, a “a campainha e cão feroz”, e Cacau “meiga e de boa na vida”! E o Marley, por alguns dias, vulgo “Vírgula”!

Qui Gérald, você também faz parte dessa família e claro o gordinho, Mingau! Obrigada pela amizade, pelas risadas, nossa viagem aos EUA foi inesquecível (não foi, Ju e Guto!?).

Agradeço ao professor e orientador Dr. Aníbal de Sant’Anna Moretti, por tudo, pela amizade, orientação, dedicação, amizade e boas risadas na sua sala (e alguns gritos também!! Sempre acharam que o senhor estava brigando comigo, hehehehe!)

Ao pessoal que me ajudou muito no experimento, a Simone, Cláudia, Gisele, Mari, Bettah, Melissa, Diego, Gustavo, Natália! Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração, pelas risadas, por toda a ajuda! Sem vocês não seria possível!

À Simone, obrigada pelos conselhos, ideias, conversas, boas risadas e pela amizade!

À Tácia pela amizade, confiança e pela ajuda em momentos importantes nessa etapa!!!

À Claudinha, pela sincera amizade e dedicação no experimento!!

Aos estagiários sempre dedicados que vieram nos momentos certos e ajudaram muito, Mari, Dani, Jaque, Carol, Lorena, Roberta, Carol e os ingleses Aron e Jasmine!!!

Em especial, ao Fabinho e ao Marco Aurélio que sempre me ajudaram a qualquer momento, sempre dedicados! Obrigada pelas risadas, conselhos, pela amizade, pela confiança!

À Cris, pelos bons momentos e bolinhos no café da manhã na granja!

Ao Antenor e a Liza da Anatomia de São Paulo, à Flávia e Camila do VRA que ajudaram nos abates das “meninas”, concluindo uma importante etapa do experimento. Renata e Gabi, que sempre me deram bons conselhos para concluir as análises.

À pesquisadora professora Dra. Helena Emília Manso pela gentileza em colaborar conosco! E às alunas da UFRPE, Mônica, Beth e Simone, que me ajudaram com as análises! E à Carol que me aguentou por um tempo em Recife!

Ao professor Dr. André Furugen pela ajuda e pelos conselhos.

Ao Dr. Abrão, sempre ensinando e aconselhando, aguentando meus telefonemas a qualquer hora!

À Carol Tobias sempre amiga, dedicada, ensinando muito e me aguentando com as eternas dúvidas sobre estatística!

À Alessandra e Fábria da secretaria, sempre resolvendo nossos “galhos” sempre com carinho e dedicação.

Ao João Paulo da pós-graduação, por toda dedicação e atenção!

À Ester e ao PC do Ceptox, pelos conselhos e por toda ajuda!

A multidisciplinaridade do estudo envolveu os laboratórios: Laboratório de Fecundação *In Vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da FMVZ/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. José Antônio Visintin; do Laboratório de Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP, sob a responsabilidade da Prof. Dra. Paula Papa e o Laboratório de Imunohistoquímica do Dep. De Cirurgia da FMVZ/USP sob responsabilidade do professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez; ao Laboratório de Análises Socioeconômicas e Ciência Animal do Dep. de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, sob a responsabilidade do prof. Dr. Augusto Hauber Gameiro. Agradeço toda ajuda e colaboração dos professores, técnicos e seus orientados para qualidade da nossa pesquisa!

Aos professores do VNP, Dra. Cristiane, Dr. Alexandre Gobesso, Dr. Paulo Mazza, Dr. Luís Felipe, Dr. Ricardo, Dr. Marcos Veiga, Dr. Francisco Rennó, Dra. Angélica, Dr.

Messias, Dra. Maria de Fátima, Dr. Márcio, Dr. Augusto Gameiro e Dr. Lúcio Araújo, pela convivência e pelos conhecimentos adquiridos!

Ao professor Dr. Júlio Balieiro por toda ajuda e paciência!

Ao professor Dr. Caio Abércio da Silva, quem eu admiro e respeito desde a graduação.

À Clélia, esposa do professor Dr. Anibal, pela força sempre e por me aguentar em sua casa para correção da tese e relatórios!

Ao pessoal dos laboratórios do VNP, Simi, Renata, Ana, Lucinéia, Zeca, Gilson, Ari, Perna, sempre atenciosos e prestativos. Simi, ainda vamos para Recife!!!

À empresa Agrocerec, ao José Antonio Vitagliano e ao Paulo de Tarso por toda ajuda com as rações e pela amizade!

Ao pessoal da fábrica de ração, Cláudio, Israel, Zé, Fernando e ao Ioni pela ajuda e dedicação.

Ao pessoal do Matadouro-Escola da USP em Pirassununga-SP, pela compreensão e toda ajuda, que foram essenciais.

Às meninas da limpeza do VNP, sempre prestativas.

Ao Diogo, Joana e a Ju do laboratório do prof. Dr. Francisco Javier por toda dedicação e amizade!

Aos amigos que não estão mais em Pira, mas sempre que temos um tempinho nos encontramos de novo, Michele de Porto Ferreira, Ju Pin, Érika e Jefferson, Paulinha e Henry, Dani, Tácia, Carol Tobias, Daniel Emu, Octávio, Qui Gérald, Jhonny e Andréia (Deinha).

A toda galera da pós-graduação do VNP, VRA e FZEA, pelos bons momentos de risada, descontração e amizade: Milena, Ju Diniz, Ju Mega, Ju Pin, Ju Praia e Filipe, Claudinha e Gustavo, Nat (Mel e Bexiga), Vanessa, Pri, Brenda, Aline, Marcos, Roberta Alemã, Henrique, Lucas, Fred, Rafa, Dani Carmarneiro, Michele, Mineirinho, Tácia, Bettah, Gisele e Arroz, Gabi da Gaita e Tarley, Thaissa, Saara, Vanessa e Kleber, Mari, Mirto, Arroz, Moana, Gato seco, Rafa Ceará, Xibungo, Frodo, Perna, Paulinha e Luciano, Suzana, Iaçanã, Mariana, Melissa e Gustavo.

Em especial Ju Diniz, Ju Mega, Milena, Tácia, Claudinha, Natália, Ju Praia e Filipe pelo socorro nas inseminações e naquelas horas que tudo parece impossível!

Aos amigos de sempre Fernanda e João, Mariana e Roberto, Sabrina, Mateus e Marcello, Renata, apesar da distância estamos juntos.

`A Lilian e a sua filha Raquel, que me acolheram em São Paulo para realização das minhas análises na USP.

À Belinha e a Cacau, minha cachorras, que sempre me recebem com alegria quando chegava em casa cansada!

Agradeço às 50 marrãs, aos 3 cachacos, Huguinho, Zezinho e Luisinho, e aos 184 leitões por colaborarem com essa pesquisa e me ensinar muito!!! E a gata “véia”, *in memoriam*, que sempre foi companheira e ao Rodolfo, gatão!

Por Tudo! Obrigada!

RESUMO

PARAZZI, L. J. **Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie.** [Effects of sow dietary L-glutamine and L-glutamic acid supplementation on reproductive and productive performance of progeny]. 2014. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A glutamina (Gln) e o glutamato (Glu) participam ativamente do metabolismo, sendo fontes de energia para células de intensa proliferação, como enterócitos, células do sistema imune, trofoblastos e embriões. O objetivo geral foi avaliar os efeitos da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico (1%) nas dietas: (a) marrãs desde a chegada ao local de experimentação até a manifestação do primeiro estro, seguido do primeiro ciclo estral e flushing (capítulo I), (b) primíparas no terço final da primeira gestação, seguida da lactação, intervalo desmame estro e terços inicial e médio até 73 dias da gestação subsequente (capítulo II); e nas dietas de leitões do desmame aos 49 dias de idade (capítulo III). No capítulo I, as fêmeas suplementadas durante o flushing, foram abatidas aos 5 dias de gestação para avaliação dos embriões e ovário. O número de corpos lúteos do grupo suplementado foi superior numericamente ao grupo controle (20,25 versus 17,88, respectivamente), sugerindo possível efeito da suplementação na taxa de ovulação, acompanhado do maior percentual de células vivas e menor de células mortas, com significância nas variâncias, indicativas de menor variabilidade e melhor homogeneidade das estruturas, levando a possível influência na viabilidade embrionária. No capítulo II, os pesos corporais e as espessuras de toucinho (ET) das primíparas não revelaram diferenças significativas nos períodos analisados. As concentrações de glutamina e glutamato no plasma sanguíneo foram significativas para o tratamento ($p < 0,05$) até o parto, revelando concentrações maiores para as fêmeas suplementadas. Destacou-se diferença significativa na sobrevivência dos leitões no aleitamento em favor do grupo suplementado. Aos $73,45 \pm 1,61$ dias da segunda gestação, o peso dos fetos do grupo suplementado ($p = 0,0690$) foi maior em relação aos do grupo controle. Os leitões desmamados (Capítulo III) foram avaliados em arranjo fatorial 2×2 , sendo um fator a suplementação da mãe e outro a suplementação dos leitões. O peso ao desmame foi significativo para o fator Mãe, destacando maiores pesos para os leitões oriundos de mães controles ($p = 0,0296$), contudo de 21 a 34 dias de idade, a conversão alimentar foi melhor para os leitões oriundos de mães suplementadas ($p = 0,0522$). Ao final da terminação (133 dias de

idade), os tratamentos não mostraram diferenças significativas em relação ao desempenho. Considerando que o peso dos leitões de mães controles iniciou superior ao desmame, os grupos se igualaram em relação ao peso final. Os resultados trazem novas perspectivas para futuras pesquisas em relação ao uso da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico, principalmente no flushing, nos terços inicial e médio da gestação, pois, pode influir positivamente na taxa de ovulação e desenvolvimento homogêneo e maior peso dos fetos. Além disso, a ação no desenvolvimento dos leitões, sobrevivência no aleitamento e quanto à integridade intestinal no período pós desmame também merecem atenção, o que pode contribuir, na abordagem interativa dos parâmetros, influência positiva na economia da produção.

Palavras-chave: Glutamina. Mães. Gestação. Ovulação. Lactação.

ABSTRACT

PARAZZI, L. J. **Effects of sow dietary L-glutamine and L-glutamic acid supplementation on reproductive and productive performance of progeny** [Efeito da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de marrãs sobre o desempenho reprodutivo e produtivo da progênie]. 2014. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Glutamine (Gln) and glutamate (Glu) actively participate in metabolism as energy sources for intense cells proliferation, such as enterocytes, immune cells, and embryos trophoblasts. The main objective was to evaluate the effects of L-glutamine and L-glutamic acid (1%) supplementation in the diets: (a) sows since arrival to the experimental place until the appearing of the first heat, followed by the first estrous cycle and flushing (chapter I), (b) gilts at the end of the first third of pregnancy, then lactation, weaning estrus interval and initial and middle thirds of up to 73 days of gestation subsequent (Chapter II); and in weaning diets of piglets at 49 days of age (Chapter III). In Chapter I, the females supplemented during the flushing were slaughtered at the 5th gestation day for embryos and ovary evaluation. The number of *corpora lutea* in the supplemented group was numerically higher than in the control group (20.25 vs. 17.88, respectively), suggesting a possible effect of supplementation on ovulation rate, accompanied by the highest percentage of live cells and smaller percentage of dead cells with significance on variances, which are indicative of lower variability and better structures homogeneity, leading to possible influence on embryo viability. In Chapter II, *primiparous* revealed no significant differences in the weights backfat thickness at the end of gestation, lactation and subsequent pregnancy. The glutamine and glutamate concentrations in blood plasma were significant for the treatment ($p < 0.05$) until delivery, showing higher concentrations for supplemented females. Noteworthy the significant difference in the piglets survival during lactation in favor of the supplemented group. At 73.45 ± 1.61 days of the second pregnancy, the fetal weights in the supplemented group ($p = 0.0690$) was higher compared to the control group. Weaned piglets (Chapter III) were evaluated in a 2x2 factorial arrangement, with mother supplementation and piglets supplementation as factors. The weaning weight was significant for the control group, regardless of mothers supplementation ($p = 0.0296$), however, from 21 to 34 days of age, feed conversion was better for piglets from supplemented mothers ($p = 0, 0522$). By the end of termination (133 days of age), the treatments did not show significant differences, considering that the weight of

controls piglets was heavier at weaning, the animals were equal with respect to final weight. The results open new perspectives for future research regarding the use of L-glutamine and L-glutamic acid supplementation, especially in flushing, in the early and middle thirds of pregnancy, since it can have a positively influence in ovulation rate, homogeneous development and greater *fetues* weight. Moreover, its effect on piglets development, both in the survival during lactation aspect, as to gut integrity in the post weaning period, also deserve attention, since the interactive approach can provide additives in the production economy.

Keywords: Glutamine. Sows. Pregnancy. Ovulation. Lactation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes, níveis nutricionais e níveis de garantia das dietas de reposição, controle e suplementação e da ração de gestação	45
Tabela 2 - Médias e desvio padrão, da duração dos estros (em horas) e dos ciclos estrais (dias) de acordo com os tratamentos	51
Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão do peso médio (kg) das fêmeas, ao início do experimento, ao 7º, 29º e 49º dia de experimento e ao 5º dia de gestação	52
Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão do ganho de peso médio diário (kg) das fêmeas, do início do experimento ao 7º dia, 8º ao 28º dias, do 29º ao 48º dia e 49º ao 5º dia de gestação.....	53
Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão do consumo de ração médio diário (gramas) das fêmeas, da chegada ao 7º dia, 8º ao 28º dias, do 29º ao 48º dia e 49º ao 5º dia de gestação.....	53
Tabela 6 - Médias e desvios padrão do peso do aparelho reprodutor (kg), número de corpos lúteos, percentagem de células vivas, de mortas, taxa de embriões recuperados (embriões rec), percentual de blastocistos (blast), blastocistos expandidos e eclodidos	57
Tabela 7 - Ingredientes, níveis nutricionais e níveis de garantia das rações experimentais de gestação (Controle e Suplementação) e lactação (Controle e Suplementação)	71
Tabela 8 - Valores médios e desvios padrão do peso em quilos, das fêmeas ao início do tratamento, aos 75, 83, 91, 99 e 107 dias de gestação e após o parto.....	78
Tabela 9 - Valores médios e desvios padrão da espessura de toucinho (ET) em milímetros das fêmeas ao início do tratamento, durante o final da gestação e após o parto.....	79
Tabela 10 - Concentração de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no plasma das fêmeas no final da gestação e após o parto	79
Tabela 11 - Concentração de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no plasma das fêmeas durante a lactação e ao desmame.....	80
Tabela 12 - Valores médios e desvios padrão do número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos, mumificados, peso da placenta (kg), mortalidade	

no aleitamento (percentual de leitões mortos), leitões leves (nasceram com peso inferior a 1,100 gramas) e os pesos (nascimento, 7, 14 e desmame) e ganhos de pesos (nascimento a 7, 7 a 14 e 14 ao desmame) dos leitões durante o aleitamento.....	81
Tabela 13 - Percentual de gordura, concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no colostro, conforme os tratamentos	82
Tabela 14 - Percentual de gordura no leite das primíparas e desvios padrão, aos 7, 14 dias e ao desmame, de acordo com os tratamentos	82
Tabela 15 - Concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) no leite e desvios padrão durante a lactação, aos 7 e 14 dias e no desmame, conforme os tratamentos.....	83
Tabela 16 - Valores médios e desvios padrão do intervalo desmame estro (IDE) em dias e horas de duração do estro.....	83
Tabela 17 - Valores médios e desvios padrão do peso (kg) e da espessura de toucinho (ET) em milímetros das fêmeas aos $73,45 \pm 1,61$ dias da segunda gestação	84
Tabela 18 - Valores médios e desvios padrão do peso do útero em quilos, número de corpos lúteos nos ovários direito (CL dir) e esquerdo (CL esq), totais (CL totais), taxa de ovulação (Tx ov), número de fetos encontrados nos cornos uterinos direito (N fetos dir) e esquerdo (N fetos esq), totais (N fetos totais), peso placenta (PLA) em quilos, peso médio dos fetos (Peso fetos) em quilos e a medida média (Medida fetos) dos fetos em centímetros.....	84
Tabela 19 - Concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) nos líquidos fetais (alantoide e amniótico) e desvios padrão de acordo com os tratamentos.....	85
Tabela 20 - Ingredientes e níveis nutricionais das dietas pré iniciais: Controle e Tratamento; Iniciais I: Controle e Tratamento, Inicial II, Recria e Terminação	102
Tabela 21 - Valores médios e erro padrão do peso dos leitões (kg), no desmame aos 21 dias, aos 35, 50, 70, 110 e 133 dias de idade.....	108
Tabela 22 - Valores médios e erro padrão do consumo de ração do desmame aos 34, 35 a 49, 50 a 70, 71 a 110 e 111 a 133 dias de idade dos leitões	109
Tabela 23 - Valores médios e erro padrão do ganho de peso médio diário no desmame, entre 21 e 34, 35 e 49, 50 a 70, 71 a 110 e 111 a 133 dias de idade dos leitões..	109
Tabela 24 - Valores médios e erro padrão da conversão alimentar de 21 aos 34, 35 a 49, 50 a 70, 71 a 110 e 111 a 133 dias de idade dos leitões	110

Tabela 25 - Valores médios e erro padrão, dos percentuais de animais que apresentaram diarreia dos 21 aos 34, 35 a 49 e 50 a 70 dias de idade dos leitões.....	110
Tabela 26 - Valores médios e erro padrão, da porcentagem de animais que apresentaram anticorpos contra Streptococcus suis no dia da 1ª dose da vacina e 36 dias após.....	111
Tabela 27 - Médias e erro padrão das concentrações de glutamina e glutamato (G+G) no plasma ($\mu\text{mol/mL}$) dos leitões abatidos ao desmame.....	111
Tabela 28 - Médias e erro padrão das concentrações de glutamina e glutamato (G+G) no plasma ($\mu\text{mol/mL}$) dos leitões aos 49 dias de idade.....	111
Tabela 29 - Médias e erro padrão das concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no plasma dos leitões aos 45 e 8 dias de idade	112
Tabela 30 - Médias da contagem de células da mucosa e erro padrão ao desmame no duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso (IG) dos leitões abatidos	112
Tabela 31 - Médias da contagem de células e erro padrão aos 49 dias de idade dos leitões aos 49 dias de idade duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso (IG).....	113
Tabela 32 - Receitas e Custos dos animais suplementados e não suplementados.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fêmeas na Unidade de Gestação do Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS) ...	43
Figura 2- Recuperação e observação dos embriões.....	50
Figura 3 - Níveis de cortisol em $\mu\text{g/dL}$ dos tratamentos nos dias representados pelo 1º ciclo estral.....	54
Figura 4 - Níveis de progesterona (ng/mL) dos tratamentos nos dias representados pelo 1º ciclo estral.....	55
Figura 5 - Níveis de estradiol (pg/mL) dos tratamentos nos dias representados pelo 1º ciclo estral.....	56
Figura 6 - Mensuração da ET por.....	72
Figura 7 - Transferência do sobrenadante	74
Figura 8 - Pesagem das amostras.....	74
Figura 9 - Neutralização das amostras.....	74
Figura 10 - Espectrofotômetro	74
Figura 11 - Leitões alojados na creche.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aminogut®	L-glutamina e L-ácido glutâmico (Ajnomoto Animal Nutrition)
BIOPA	Laboratório de Biologia molecular Aplicada à Produção Animal
CMDR	Consumo médio diário de ração
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ET	Espessura de toucinho
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GLN	Glutamina
G+ G	Glutamina e Glutamato
GLU	Glutamato
GPMD	Ganho de peso médio diário
IA	Inseminação artificial
IDE	Intervalo desmame estro
kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LH	Hormônio luteinizante
LPS	Laboratório de Pesquisa em Suínos
nm	Nanômetros
PCA	Ácido perclórico
PF	Peso Final
PI	Peso inicial
PM	Peso médio
TRIS	Solução tampão
TV	Tubo vazio
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo
VNP	Departamento de Nutrição e Produção Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	PRODUTIVIDADE DA FÊMEA SUÍNA	26
2.2	GLUTAMINA E GLUTAMATO	27
2.3	EFEITOS NA NUTRIÇÃO DA FÊMEA REPRODUTORA.....	31
2.4	INTERFERÊNCIA NOS LEITÕES.....	36
3	CAPÍTULO I: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NO PRIMEIRO CICLO ESTRAL E FLUSHING SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS.....	40
3.1	INTRODUÇÃO	41
3.2	MATERIAL E MÉTODO	42
3.2.1	LOCAL E INSTALAÇÕES	42
3.2.2	ANIMAIS E PREPARAÇÃO.....	43
3.2.3	ALIMENTAÇÃO	44
3.2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS	45
3.2.5	AVALIAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO PONDERAL.....	46
3.2.6	AVALIAÇÃO HORMONAL.....	46
3.2.7	TAXA DE OVULAÇÃO E VIABILIDADE EMBRIONÁRIA	48
3.2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3.3	RESULTADOS.....	51
3.3.1	DESEMPENHO PONDERAL E CICLICIDADE NO PERÍODO PÓS-PÚBERE	51
3.3.2	AVALIAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	56
3.4	DISCUSSÃO	57
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
4	CAPÍTULO II: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA DE PRIMÍPARAS NO FINAL DA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO E DESEMPENHO REPRODUTIVO NA GESTAÇÃO SUBSEQUENTE	67
4.1	INTRODUÇÃO	68
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	69
4.2.1	LOCAL E INSTALAÇÕES	69
4.2.2	ANIMAIS E PREPARAÇÃO.....	69
4.2.3	MANEJO ALIMENTAR.....	70
4.2.4	TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	71
4.2.5	PESO E ESPESSURA DE TOUCINHO.....	72
4.2.6	NÍVEIS DE GLUTAMINA E GLUTAMATO	72
4.2.6.1	PLASMA SANGUÍNEO.....	73
4.2.6.2	COLOSTRO E LEITE	75
4.2.6.3	NÍVEIS DE GLUTAMINA E GLUTAMATO	75
4.2.7	PERCENTUAL DE GORDURA	75
4.2.8	LEITÕES NO ALEITAMENTO.....	76
4.2.9	INTERVALO DESMAME ESTRO	76

4.2.10	AVALIAÇÃO DOS OVÁRIOS E FETOS DA GESTAÇÃO SUBSEQUENTE.....	76
4.2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
4.3	RESULTADOS.....	78
4.4	DISCUSSÃO	85
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
5	CAPÍTULO III: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA LEITÕES DESMAMADOS SOBRE A FREQUÊNCIA DE DIARREIA, IMUNIDADE, HISTOLOGIA INTESTINAL E DESEMPENHO ATÉ O ABATE	97
5.1	INTRODUÇÃO	98
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	99
5.2.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES.....	99
5.2.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS.....	100
5.2.3	ALIMENTAÇÃO	101
5.2.4	DESEMPENHO.....	103
5.2.5	FREQUÊNCIA DE DIARREIA	103
5.2.6	RESPOSTA VACINAL	103
5.2.7	NÍVEIS DE GLUTAMINA E GLUTAMATO NO PLASMA	104
5.2.8	ANÁLISE HISTOLÓGICA	105
5.2.9	ANÁLISE ECONÔMICA	106
5.2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	107
5.3	RESULTADOS.....	108
5.4	DISCUSSÃO	114
5.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
6	CONCLUSÃO	124
	REFERÊNCIAS	126

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Para atender as exigências nutricionais de fêmeas suínas hiperprolíficas, vários estudos são necessários, principalmente os relacionados à nutrição proteica, e nesse particular, as necessidades em aminoácidos das dietas.

Nas dietas para as matrizes, o interesse inicial seria as marrãs nos períodos pré e pós-púbere, estendendo-se ao primeiro e segundo partos, em que tais dietas deveriam atender além do desenvolvimento corporal, o complexo anátomo fisiológico do aparelho gênito urinário, pois, deve ser ressaltado que a fêmea ainda não atingiu sua massa corpórea adulta, devendo acumular reservas para responder adequadamente na sua vida útil reprodutiva. Whittemore (1996), Verstegen, Moughan e Schrama (1998) acrescentam nessas necessidades a inclusão de parâmetros como o desenvolvimento embrionário e fetal, o catabolismo da primeira lactação e o retorno à ciclicidade pós desmame, o que vem sedimentar, na dinâmica interativa da espécie, a importância desses requisitos para a mais adequada vida útil reprodutiva.

Gaughan et al. (1997) já sugeriam que se a marrã não alcançar seu ótimo nível de retenção proteica, o desenvolvimento reprodutivo seria afetado, sendo confirmado por Cia et al. (1999), que diz sobre a redução da massa proteica, que pode afetar o estado metabólico e influenciar o desempenho reprodutivo subsequente.

Na verdade, os momentos importantes e cruciais representados pelo 1º e 2º catabolismos das duas primeiras lactações revelam a necessidade de haver menores perdas de tecido adiposo e massa muscular, sendo a perda proteica de maior influência na queda dos níveis metabólicos e hormonais, originando condição desfavorável com reflexos negativos na eficiência reprodutiva.

Os aminoácidos não essenciais, ou seja, que podem ser produzidos pelo organismo conforme sua necessidade, como o caso da glutamina (Gln) e do glutamato (Glu), correspondem de 5 a 15% dos aminoácidos na maioria dos alimentos e rações para animais, mas pouco é absorvido da dieta (CURTHOYS; WATFORD, 1995).

A glutamina em situações de estresse e catabolismo intenso tem sido denominada como “condicionalmente essencial”, uma vez que participa ativamente no metabolismo proteico, além de inúmeras funções biológicas, que a tornam essencial em condições catabólicas (MANSO, 2006), como ocorre na lactação. Manso (2006) ratifica ainda, que participando a glutamina de diversos processos metabólicos e principalmente em processos de

catabolismo, como a lactação, haveria a justificativa para o seu uso também durante esse período.

No metabolismo da Gln e Glu, estes participam da síntese de outros aminoácidos e fornecem energia para células de intensa proliferação, como enterócitos, células do sistema imune, trofoblastos e embriões. Dada a sua participação no metabolismo de forma intensa, Wu et al. (2011) acreditam que a glutamina deveria constar nas tabelas de exigências do NRC, participando da formulação das dietas dos suínos.

A glutamina é um aminoácido livre encontrado em maior quantidade no corpo dos mamíferos, na circulação sanguínea, e o glutamato no espaço intracelular (NEWSHOLME et al., 2003; MANSO FILHO et al., 2008).

A glutamina possui algumas funções como fonte de energia para a síntese dos nucleotídeos e para as células de crescimento rápido, como os enterócitos e as células do sistema imunológico, podendo ocorrer atrofia das vilosidades intestinais e diminuição nas defesas do organismo quando há deficiência desse aminoácido (KITT; MILLER; FISCHER, 2004; MANSO, 2006).

Por isso, na nutrição de leitões pós desmame a glutamina tem sido utilizada com o glutamato, incluídos na formulação como aminoácidos sintéticos, o que pode contribuir para amenizar o estresse do desmame e melhorar o desempenho dos animais.

Outra função importante desses aminoácidos é a participação na síntese de purinas e pirimidinas, essenciais para a proliferação celular, e da glutathione, um antioxidante celular importante (WU, 1998).

A glutamina regula as vias metabólicas vitais para a saúde, crescimento, desenvolvimento, reprodução e a homeostase dos animais, e é precursor fundamental da síntese de diversas moléculas, sendo, portanto necessária na produção animal (WU, 2010c).

Assim, pesquisas vêm demonstrando a importância da glutamina, que além de desempenhar papel importante no metabolismo proteico, constitui-se no aminoácido livre mais encontrado no fluido amniótico nos primeiros meses de gestação, (WU; MEIER; KNABE, 1996), sendo extraídas grandes quantidades pelo feto durante a prenhez e da glândula mamária durante a lactação (MANSO FILHO et al., 2008), e encontrada em grandes quantidades no leite (RHOADS; WU, 2009; MANSO et al., 2012).

Diante do exposto, a proposta da pesquisa foi analisar os efeitos da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico nas dietas, sobre as características produtivas e reprodutivas de marrãs e primíparas, divididos em 3 capítulos.

O primeiro, envolvendo marrãs nos períodos pré e pós-púbere, com a suplementação de 1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta, durante o primeiro ciclo e flushing alimentar com as avaliações dos embriões e ovários aos 5 dias de gestação.

No segundo estudo, analisou-se a mesma suplementação na dieta de primíparas no final da gestação, lactação, intervalo desmame e terços inicial e médio da gestação subsequente, aliados aos efeitos produtivos e reprodutivos aos 73 dias de gestação. O terceiro estudo avaliou a suplementação na dieta dos leitões oriundos dessas fêmeas, a partir do desmame aos 21 dias de idade, os quais foram suplementados até 49 dias de idade, e acompanhados até a fase da terminação.

As análises associativas abrangeram avaliações de caráter reprodutivo, aliados aos nutricionais, clínicos e seus possíveis efeitos no desempenho de leitões até o abate.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir serão abordados aspectos sobre a produtividade das fêmeas suínas, o metabolismo da glutamina e do glutamato, assim como seus efeitos nas matrizes e leitões descritos na literatura.

2.1 PRODUTIVIDADE DA FÊMEA SUÍNA

Para a produção do maior número de leitões/porca/ano, deve-se almejar na matriz, aliada a sua prolificidade, longa vida útil reprodutiva. Nesta condição, diversos fatores influenciam a eficiência da vida reprodutiva da fêmea, onde a multifatorialidade deve ser adequadamente investigada para que possam ser diagnosticados, na convergência da interação dos fatores, os aspectos que vão interferir diretamente na melhora da produtividade. Assim sendo, os diferentes programas, sanitário, reprodutivo, nutricional, manejo e outros se inter cruzam na dinâmica do sistema de produção para o aperfeiçoamento de sua eficiência produtiva e reprodutiva.

No manejo reprodutivo, como exemplo, a biotécnica da inseminação artificial vem possibilitar a introdução de reprodutores de alto valor genético, os quais influenciam no melhor controle da eficiência reprodutiva, havendo a mais acurada detecção de falhas reprodutivas tanto de machos, quanto de fêmeas (VIANNA et al., 2003), além de ser uma técnica fácil de ser realizada por pessoal treinado.

Protocolos hormonais vêm sendo utilizados experimentalmente com sucesso na sincronização do estro à puberdade. Os estudos têm sido desenvolvidos com a aplicação da gonadotrofina coriônica equina (eCG), seguido do hormônio luteinizante (LH) suíno. Aliada a essa prática, o acompanhamento da ciclicidade e da condição corporal e metabólica da fêmea tem sido investigados, com o objetivo de melhor preparar a marrã a ser incorporada ao plantel, possibilitando maior longevidade (CARBONE, 2002; GAMA et al., 2002; LAGO, 2003; VIANNA et al., 2003; PINESE, 2005; ECKHARDT, 2009; SILVA, 2014).

Considerando as linhagens hiperprolíficas atuais e o ciclo reprodutivo curto, a atenção deve estar voltada para a manutenção de um estado de saúde da fêmea que venha traduzir uma vida reprodutiva ideal.

O preparo da fêmea jovem, neste particular, para enfrentar a primeira lactação, ou seja, o primeiro catabolismo tem sido um objetivo comum, principalmente voltado aos programas nutricionais e aprofundamentos das necessidades destas fêmeas atuais, pois, é conhecida a síndrome do segundo parto (SCHENKEL et al., 2010). Isso reflete o complexo multifatorial que devido ao inadequado preparo da marrã, tem levado a índices de descarte precoce de fêmeas, justamente pela vida útil reprodutiva curta com baixa eficiência relacionadas a preparação da marrã inadequada.

2.2 GLUTAMINA E GLUTAMATO

As pesquisas nutricionais avançam principalmente no tocante a conceituação de proteína ideal e a introdução de aminoácidos sintéticos na formulação de dietas para fêmeas suínas, dada as novas linhagens de fêmeas híbridas hiperprolíficas no mercado (KIM, et al., 2009). Paralelamente, muito há de ser investigado sobre as exigências das reprodutoras nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, a fim de se obter um melhor aproveitamento da proteína dietética ao menor custo e menor produção de resíduos ao meio ambiente (BRUMANO, 2008; FIALHO et al., 2008).

Muito embora, existem estudos sobre as exigências de aminoácidos na nutrição em suínos envolvendo lisina, metionina, treonina, triptofano e em escala menor, valina, glutamato e glutamina, poucas são as informações sobre os efeitos dos aminoácidos e os níveis de inclusão na dieta para atender as exigências nutricionais em cada fase do ciclo reprodutivo da matriz.

Dentre os aminoácidos sintéticos utilizados na nutrição de suínos, estão a glutamina e o glutamato, aminoácidos não essenciais, envolvidos em muitas funções metabólicas do organismo, sendo o glutamato precursor da glutamina, que é requerida por várias células, mas em alguns processos a importância é dada ao seu precursor (NEWSHOLME et al., 2003).

A glutamina sintetase e a glutaminase são as enzimas responsáveis pela síntese ou degradação da glutamina, respectivamente através da glutaminase, a formação de glutamato e

amônia ocorrem pela desaminação da glutamina (ZAVARIZE et al., 2010). A glutaminase catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e amônia. Assim, o glutamato, é o produto do metabolismo da glutamina em muitas células, através da enzima glutaminase encontrada em alta concentração em células que utilizam prontamente a glutamina (NEWSHOLME et al., 2003).

A glutamina é um L- α -aminoácido (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009), possui dois grupos nitrogenados em sua estrutura que a diferenciam dos outros aminoácidos, um alfa amino e outro amida (DARMAUN; HUMBERT, 2000; SANTIAGO, 2013). A glutamina (C₅H₁₀N₂O₃) possui em sua estrutura 41,09% de carbono, 32,84% oxigênio, 19,17% nitrogênio e 6,90% de hidrogênio (CURI, 2000).

No seu metabolismo a glutamina pode seguir dois caminhos. O nitrogênio da porção amino, pode ser utilizado para a síntese de açúcares e o nitrogênio da porção amida servir para a síntese de purinas e pirimidinas (SILVA, 2008). Outro caminho seria a síntese de outros aminoácidos como a arginina, ornitina e prolina, através do nitrogênio da porção amino (WU, 1998).

A absorção da glutamina é feita pelos enterócitos, sendo transportada através do sistema transportador de nitrogênio dependente de sódio e liberada no sangue pelo sistema porta (SOUBA et al., 1990).

Por ser um aminoácido não essencial, a glutamina é sintetizada pelo organismo de acordo com sua necessidade, sendo precursor de outros aminoácidos essenciais e possuindo inúmeras funções biológicas, que a tornam essencial em condições de catabolismo (MANSO, 2006). Além disso, é o α -aminoácido livre mais abundante no corpo dos mamíferos, e, grandes quantidades são extraídas pelo feto durante a prenhez e da glândula mamária durante a lactação (MANSO FILHO et al., 2008).

A glutamina é sintetizada primeiramente no músculo esquelético, a partir de amônia e glutamato, produto de transaminação de aminoácidos ramificados, como o α -cetoglutarato (WU; BAZER; TOU, 2005).

Dentre as inúmeras funções da glutamina, destacam-se: o controle, da alcalinidade sanguínea e do volume de água nas células por ser transportada pelo sódio; regulação da expressão de certos genes na biossíntese do DNA e RNA; o desenvolvimento muscular; a participação como fonte de energia sintetizada pelo fígado em glucose; fonte de energia para os enterócitos, sintetizada em CO₂, alanina, prolina, lactato, citrulina e amônia; síntese de purinas e pirimidinas, importantes na proliferação celular; participação da síntese de

glutathiona, amino açúcares e da proteína muscular, ao mesmo tempo em que participa na inibição da degradação da proteína muscular; participação na formação da matriz celular, ajudando no crescimento e remodelagem dos tecidos; participação da síntese de aminoácidos, como alanina, citrulina, prolina e arginina no intestino delgado; participação da síntese de óxido nítrico a partir da arginina em células endoteliais, controlando o fluxo sanguíneo e a absorção de nutrientes; estimulação da secreção da insulina pelas células β do pâncreas (NEWSHOLME et al., 2003; WATFORD¹, 2004 apud MANSO, 2006; WU et al. 2010).

A glutamina sintetase (GS) e a glutaminase são enzimas responsáveis diretas pela síntese de glutamina a partir do glutamato e por sua degradação em glutamato. A glutaminase catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio. A glutamina sintetase, por sua vez, é essencial na regulação do metabolismo celular do nitrogênio, pois, catalisa a conversão de glutamato em glutamina usando amônia como fonte de nitrogênio, sendo necessária à vida de micro-organismos, plantas e animais (FRANCISCO et al., 2002). A glutaminase hidrolisa a glutamina em glutamato, e esta enzima é encontrada em alta concentração no organismo (NEWSHOLME et al., 2003).

No transporte de nitrogênio aproximadamente 1/3 deste no plasma está na forma de glutamina (FRANCISCO et al., 2002), e desse modo tem ação nas células em crescimento rápido, no caso, os enterócitos, linfócitos, pois, pode ser completamente oxidada e formar CO₂, ou convertida em vários metabólitos intermediários, doando um grupo amina em diversas reações de transaminação, inclusive síntese de nucleotídeos, (purinas e pirimidinas) necessários para a proliferação celular (CURI, 2000; FRANCISCO et al., 2002; CURI et al., 2005).

A glutamina é sintetizada diferentemente de acordo com o tipo de tecido e metabolizada por vários órgãos, sendo o intestino o principal. Os órgãos produtores de glutamina são os pulmões, fígado e os músculos esqueléticos (NEWSHOLME² et al., 1989 apud FRANCISCO et al., 2002, p.83).

As células intestinais utilizam glutamina seja dos nutrientes ingeridos da dieta ou do sangue (PALANCH, 2000). Os enterócitos participam ativamente do metabolismo da

¹ WATFORD, M. Keep your brain happy. Lecture Notes, Rutgers University, News Brunswick. USA, 81p., 2004.

² NEWSHOLME, E. A. et al. Glutamine metabolism in different tissues its physiological importance. In: Perspectives in Clinical Nutrition. KINNEY J.M. & BORUM P.R. (Eds.), Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 1989. P.71-97.

glutamina (PALANCH, 2000), podendo gerar cerca de 30 mols de ATPs através do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (SOUBA et al., 1990).

Através da GS o glutamato e o NH_4^+ combinados podem formar a glutamina que será transportada para fora da célula, como no músculo esquelético e fígado (NEWSHOLME et al., 2003). Pela sua extensão, o músculo esquelético, é considerado um sítio de produção de glutamina de extrema importância (CEDDIA; GARCIA JÚNIOR; CURI, 2000), e a circulação sanguínea fornece glutamato, para sua síntese (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

O glutamato também pode fazer parte da síntese de outros aminoácidos e ainda da glutathiona, um importante antioxidante intracelular (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

No metabolismo de outros aminoácidos o L-glutamato pode perder o grupo amino como o NH_4^+ (desaminação) ou doar para a síntese de outros por transaminação (NEWSHOLME et al., 2003). Dentre as funções do glutamato, destacam-se, fonte de energia para renovação celular da mucosa; fonte de nitrogênio para síntese de outros aminoácidos; como arginina e prolina e precursor da glutathiona (YI; ALLEE, 2004; CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009), importante na regeneração e preservação das células intestinais (REEDS³ et al., 1997, apud, HANCZAKOWSKA; NIWIŃSKA, 2013).

Os dois aminoácidos, Glu e Gln, fornecem metade da exigência em nitrogênio para a síntese de nucleotídeos (LOBLEY; HOSKIN, MCNEIL, 2001), tendo papel importante no metabolismo do nitrogênio (NEWSHOLME et al., 2003).

Fluidos fisiológicos, como o plasma, músculo esquelético, leite de fêmeas suínas e fluído alantoide ovino, são abundantes em glutamina livre (WU et al., 2006).

Diante das inúmeras funções metabólicas, as quais, a glutamina e o glutamato, estão envolvidos, são temas de diversas pesquisas, como suplementos para porcas e leitões, além de peixes, equinos, aves e humanos (KITT; MILLER; FISCHER, 2004; ZOU et al, 2006; SILVA, 2008; CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; MANSO FILHO, et al, 2008; MANSO et al., 2012, CABRERA et al., 2013).

³ Reeds P.J., Burrin D.G., Stoll B., Jahoor F., Wykes L., Henry J., Frazer M.E. (1997). Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. *Am. J. Physiol.*, 273: E408–E415

2.3 EFEITOS NA NUTRIÇÃO DA FÊMEA REPRODUTORA

Alguns parâmetros relacionados ao padrão de desenvolvimento do animal são considerados na seleção genética das fêmeas reprodutoras, o desenvolvimento corporal e a função reprodutiva. Aliado a condição de que a maturidade corporal é atingida entre o 2º e 3º partos, pois, até este momento o animal está em desenvolvimento, e ainda responde aos requisitos das primeiras gestações.

Estudos clássicos (BELTRANENA⁴, 1992, apud PATTERSON, 2001) envolvendo o crescimento de marrãs e a relação com idade à puberdade evidenciaram efeito quadrático da relação ganho de peso no período pré-púbere e idade a puberdade, sendo estabelecido um ganho de peso na faixa de 630 a 700 gramas da marrã associado à menor idade a maturidade sexual, havendo os diferenciais de aumento da idade e a dependência da genética.

As fases pré e pós-púbere estão relacionadas ao manejo do *pool* de marrãs que serão incorporadas ao plantel de matrizes do sistema de produção, tendo efeito na redução dos dias não produtivos e do intervalo entre partos. Deste modo, deve-se melhorar a fertilidade no primeiro parto, sendo dependente dos programas de manejo estabelecidos até a primeira monta ou inseminação artificial, cujo objetivo é adequar o peso e a espessura de toucinho dentro da linhagem híbrida (FOXCROFT; AHERNE⁵ 2001, apud PATTERSON, 2001, p.01).

Nesta busca, estudos relacionam a puberdade com alguns fatores, associando a maturidade sexual ao nível de gordura (GAUGHAN et al., 1997), ganho de peso (BELTRANENA⁴, 1992, apud PATTERSON, 2001, p.02), relação carne/gordura (KIRKWOOD; AHERNE, 1985), estado metabólico (KENNEDY; MITRA, 1963) e massa proteica (CIA et al., 1999). Portanto, informações que relacionem a taxa de crescimento pré-púbere, ciclicidade pós-púbere e condição do animal na idade a primeira monta ou inseminação artificial, com o desempenho reprodutivo futuro precisam ser melhor identificados.

Um fato que também merece destaque está relacionado ao nível nutricional na fase pré ovulatória do ciclo estral, prevendo-se efeito na heterogeneidade do desenvolvimento folicular e conseqüentemente dos oócitos, e dependentes dos efeitos na concentração de hormônios

⁴ BELTRANENA, E. Nutrition and reproductive development in gilts. Ph.D. Thesis. University of Alberta, Canada. p. 22-140.

⁵ FOXCROFT, G.R. and AHERNE, F.X. Rethinking management of the replacement gilt. In: Advances in Pork Production. Banff Pork Seminar. Vol. 12, p. 197. University of Alberta, Edmonton, Alberta, 2001.

circulantes, como os de crescimento, leptina, e ainda insulina e IGF-1. Estas duas últimas são importantes mediadores dos efeitos da nutrição sobre os ovários (SILVA, 2010), estimulando a secreção de LH e FSH.

A interferência da nutrição no ambiente uterino durante a fase pré ovulatória pode alterar o tempo para alcançar o pico da progesterona, caracterizando-se como fator crucial, que afeta a sincronia entre o útero e o desenvolvimento embrionário, interferindo na sua viabilidade (JINDAL; COSGROVE; FOXCROFT, 1997). Os autores consideram que a condição corporal durante a fase de lactação também pode afetar o padrão de secreção da progesterona e a sobrevivência embrionária durante a gestação seguinte. Isto leva a advertir que o controle nutricional mais apropriado para primíparas durante o início da gestação evita perdas embrionárias excessivas.

Portanto, o desenvolvimento uterino, a síntese de nutrientes, a falha no reconhecimento da prenhez, a concorrência dos embriões, somado aos fatores genéticos, são itens que contribuem para a perda embrionária (GEISERT; SCHMITT, 2002).

A fêmea suína por possuir maior perda pré-natal (até 50%), comparada as outras espécies, possui um ambiente de qualidade intrauterino inferior (BAZER et al., 2009), representado pela insuficiência das secreções uterinas e nutrição inferior das mães em relação aos fetos (KIM et al., 2009). Embora ovulem de 20 a 30 oócitos, apenas 9 a 15 leitões nascem (TOWN et al., 2005) e as maiores perdas embrionárias ocorrem durante os primeiros 30 dias de gestação (FORD; VONNAHME; WILSON, 2002).

A glutamina, no caso, é importante nessa fase inicial da gestação, por ser precursora na síntese dos nucleotídeos purina e pirimidina, essenciais para a proliferação celular, que incluem as células embrionárias e trofoblastos, (WU, 1998). Tem, portanto, ação específica sobre fases críticas do ciclo reprodutivo interferindo desse modo, na fertilidade da fêmea.

A composição da dieta durante a gestação pode trazer prejuízos às nulíparas (SILVA, 2010), pois, baixos níveis de proteína apresentam concentrações reduzidas de aminoácidos básicos como arginina, lisina e ornitina e de aminoácidos neutros como alanina, glutamina, glicina, prolina, serina, taurina e treonina na placenta e no endométrio ao nível de 16% a 30%, respectivamente. Assim, o crescimento fetal pode ser afetado, pois, a falta principalmente de aminoácidos da família da arginina, altera a angiogênese e o crescimento da placenta e embrião (SILVA, 2010).

Segundo Self et al. (2004), durante a gestação a placenta é importante para a síntese de glutamina e mesmo sendo não essencial, em situações de estresse, doenças infecciosas e

outras que levam ao catabolismo intenso, como pode acontecer na lactação, pelo fato de não ser produzida em quantidade suficiente, por isso, indica-se a suplementação nessa fase para manter equilíbrio do nível proteico (MANSO, 2006). Argumentam Lobley, Hoskin e Mcneil (2001) que em condições de alta degradação proteica, a glutamina pode atuar como um regulador metabólico para aumentar a síntese de proteína e reduzir o catabolismo, nos casos de inflamação, lactação ou subnutrição.

Manso (2006) acrescenta ainda, que durante o catabolismo os níveis plasmáticos de glutamina tornam-se insuficientes para atender a demanda, comprometendo o sistema imunológico para a maior mobilização do nitrogênio muscular e manter assim a homeostase. Da mesma forma, a perda excessiva de massa muscular na primeira lactação das primíparas, requer níveis de suplementação de glutamina, dada a sua importância nos processos catabólicos, podendo ser denominada como aminoácido condicionalmente essencial. A concentração de glutamina no sangue pode influenciar não só durante a lactação como também na recuperação pós-desmame.

Há evidências de que fêmeas com grande perda de peso na lactação tendem a retardar o cio pós-desmame, aumentando o intervalo desmame-estro (MANSO, 2006), pois, estas mobilizam proteína e gordura corporal para suportar o desenvolvimento fetal, produção de leite e crescimento da leitegada (YANG et al., 2008).

Kim et al. (2009) e Silva (2010), reforçam o fato de que na primeira gestação, como a fêmea suína encontra-se ainda em fase de crescimento, aliado aos requerimentos de sustentação para desenvolvimento dos embriões e fetos, e ainda diante do desenvolvimento da glândula mamária, há necessidade do oferecimento de um nível adequado nutricional, tanto qualitativo como quantitativo. Na forma restrita, pode tornar-se um fator limitante para ingestão de proteína, levando a influências no terço final da gestação, quando há um desenvolvimento acelerado dos fetos e hipertrofia da glândula mamária no preparo para a lactação.

As exigências de proteínas e/ou aminoácidos na gestação aumentam gradualmente devido à retenção de nitrogênio dos fetos e ao desenvolvimento da glândula mamária (OELKE, 2008), atendendo as exigências, principalmente das fêmeas hiperprolíficas de alto desempenho reprodutivo.

Por outro lado, deve-se atentar para a dependência da ingestão de nutrientes na fase lactacional, a qual, pode resultar em prejuízos na atividade reprodutiva subsequente

(CLOWES et al., 2003), pois as perdas de massa muscular são mais comuns, particularmente nas primíparas.

Neste particular, Manso (2006) encontrou melhor peso vivo de primíparas no parto para a dieta com 2,5% de L-glutamina e aos 21 dias de lactação para as dietas suplementadas com 2,5% de AminoGut® (L-Glutamina e o L-Ácido Glutâmico). A autora relata influência da suplementação de L-glutamina no aumento da espessura de toucinho no parto. Eckhardt (2009) e Eckhardt et al. (2013), trabalhando com níveis de energia mais elevados no terço final da gestação em primíparas, observaram influência positiva no peso e espessura de toucinho ao parto. Os autores destacaram maiores ganhos no final de gestação na dieta considerada de pré-lactação com maior densidade proteica e energética, influenciando positivamente no tamanho da leitegada e na viabilidade embrionária aos 5 dias da 2ª gestação, sem contudo, haver perdas excessivas de peso na lactação.

Wu et al. (2011) encontraram melhores resultados com a suplementação de 1% da glutamina na dieta de primíparas durante a lactação e verificaram que as concentrações no plasma foram superiores aos 20 dias, em relação ao grupo controle, bem como a concentração no músculo esquelético aos 14 dias de lactação.

Ainda, a concentração de glutamina no leite das fêmeas que receberam na dieta também foram superiores em relação às que não receberam. Os efeitos se manifestam principalmente nessas fases, havendo a necessidade de avaliar a condição metabólica e corporal. Nesse contexto, Eckhardt et al. (2013), evidenciaram com a dieta de maior nível de energia para primíparas no terço final da gestação, concentrações no sangue mais elevadas de colesterol e suas frações, LDL, sugerindo o efeito indireto nos níveis hormonais que mesmo observando perdas de peso na lactação na faixa dos 9 quilos, o estado metabólico conferiu condições para resposta positiva quanto aos parâmetros reprodutivos analisados, não havendo diferença significativa com o tratamento que empregou menor valor energético

Manso Filho et al. (2008) trabalharam com éguas nos estudos do metabolismo da glutamina no músculo esquelético na fase de transição (final de gestação e lactação), e observaram perda de massa muscular no terço final da gestação e durante a lactação. Essa perda é um indício de que a proteína do músculo esquelético foi mobilizada no início da lactação, pressupondo que haja fornecimento de precursores de aminoácidos para o leite e para a gliconeogênese necessária para a síntese de lactose.

A alta expressão de glutamina sintetase no músculo esquelético, juntamente com a redução da concentração de glutamina no início da lactação, suporta a afirmação da

mobilização da massa proteica das éguas em fase de lactação. Diminuições semelhantes na concentração de glutamina circulante também foram relatadas em vacas leiteiras em lactação (DOEPEL et al., 2006).

Por outro lado, porcas que apresentam perda de peso corporal médio de 1,18 kg retornam ao estro em um período inferior a seis dias, enquanto as que perdem em média 8,19 kg levam mais de seis dias para retornarem a ciclicidade (COTA et al., 2003).

Considerando o parâmetro intervalo desmame estro (IDE) que é influenciado por diversos fatores: raça, ordem de parto, perda de peso da fêmea duração da lactação, alojamento, interação social e o manejo nutricional (FAHMY; HOLTSMANN; BAKER, 1979; VESSEUR, 1997), deve-se atentar para o fato de que primíparas apresentam maiores IDE, e isto vem associado necessariamente à condição corporal que a fêmea apresenta, que acaba tendo relação com todo o evoluir do crescimento do animal desde o nascimento até as fases mais críticas pós-púbere.

Por outro lado, porcas de ordem de parição maior que já estabilizaram sua condição corporal, dada a maturidade alcançada, normalizam seu padrão hormonal mais rapidamente, apresentando um IDE mais curto, e, conseqüentemente um estro mais longo (FAHMY; HOLTSMANN; BAKER, 1979).

Segundo Ji et al. (2005), o ganho insuficiente de peso durante a gestação implica em um baixo peso ao desmame e atraso no retorno ao cio das fêmeas, por outro lado, um ganho excessivo de gordura corporal, diminui o consumo voluntário de ração durante a lactação, afetando a produção de leite da matriz. Há, portanto, muito que averiguar quando focamos nas fêmeas hiperprolíficas sensíveis em estágios anteriores a maturidade corporal.

Kitt, Miller e Fischer (2004) estudaram o efeito da suplementação com 2,5 % de glutamina, na dieta de primíparas durante a fase de lactação, e observaram 17% e 36% a mais nas concentrações plasmáticas de glutamina no 7º e no 21º dia de lactação, respectivamente, quando comparados às fêmeas mantidas com dieta controle. No entanto, Manso (2006) não observou diferença significativa da glutamina suplementada (2,5% na dieta) sobre a concentração no plasma, aos 30 dias antes do parto, no parto e aos 7 e 21 dias de lactação.

2.4 INTERFERÊNCIA NOS LEITÕES

Nos períodos mais críticos, tanto para a matriz como para os leitões, as altas concentrações de glutamina podem aumentar a imunidade da leitegada e a manutenção das vilosidades e criptas do intestino. A importância da glutamina nos períodos caracterizados como de estresse e catabolismo, fazem com que a glutamina seja utilizada de forma mais rápida e emergencial (MANSO, 2006).

No desmame, os leitões podem apresentar situações de injúria intestinal, com consequente perda de peso e queda no desempenho. A glutamina é importante para manutenção do metabolismo, estrutura e função intestinal dos leitões durante esta fase de desenvolvimento (FOX; KRIPKE; BERMAN, 1988), que por sua vez, poderia estar associado com a função da glutamina presente em maiores concentrações no leite, pois segundo Yoo, Catherine e McBurney et al. (1997), tem papel relevante no desenvolvimento e crescimento dos leitões jovens.

Acresce-se que a glândula mamária possui altos níveis de utilização de glutamina, sendo secretado no leite como aminoácido livre (MANSO, 2006), ou seja, pronto para ser absorvido. A extração de glutamina pela glândula mamária durante a lactação é muito menor que sua concentração no leite e uma grande quantidade de glutamina (20 g/d) pode ser sintetizadas pelo tecido mamário para apoiar a produção de proteínas do leite (LI, et al., 2009). Uma glândula mamária individual ganha 11,2 g de proteína no parênquima, de zero a 80 dias de gestação (ou seja, 0,14 g de proteína/d) e 115,9 g de proteína a partir dos 80 aos 114 dias (ou seja, 3,41 g de proteína/d) (KIM et al., 2009).

Kitt, Miller e Fischer (2004) encontraram um aumento de 46% na concentração de glutamina no leite com sete dias de lactação e 265% aos 21 dias de lactação, quando suplementaram as matrizes suínas com 2,5% de glutamina. Já Manso (2006) ressaltou que aos sete dias de lactação a concentração de glutamina nas fêmeas suplementadas com AminoGut® aumentou de 0,5 µmol/mL de leite para 1,1 µmol/mL, aumento de 110% na concentração de glutamina no leite.

Os leitões aos 3 dias de idade, provenientes de matrizes suplementadas com glutamina apresentaram altura das vilosidades duodenais 12% superiores quando comparados com leitões das fêmeas submetidas a uma dieta controle (KITT, MILLER; FISCHER, 2004).

Uma dieta proporcionando menores níveis de aminoácidos durante a gestação, podem não maximizar o crescimento dos leitões durante a lactação, talvez pelas reservas de proteínas inadequadas, pelo desenvolvimento limitado dos tecidos mamários, ou pelos danos causados aos fetos, prejudicando seu desempenho pós-parto (KUSINA et al., 1999).

Carvalho et al. (2008) estudaram a suplementação de 0%, 2,5% com glutamina e 2,5% de suplementação com AminoGut[®] (L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico) na dieta de primíparas a partir dos 30 dias antes da data prevista do parto até a lactação, e verificaram que as fêmeas que receberam o AminoGut[®] apresentaram 0,7% e 3% de leitões nascidos vivos e leitões nascidos totais, respectivamente, a mais no segundo parto, quando comparado com o primeiro parto. Segundo os autores o intuito de suplementar a ração de porcas primíparas com glutamina é de atender a alta demanda desse aminoácido no período de gestação e lactação, minimizando o decréscimo no número de leitões na segunda parição.

Wu et al. (2011) encontraram melhores resultados com a suplementação de 1% da glutamina na dieta de primíparas durante a lactação e verificaram que o peso ao desmame e a sobrevivência dos leitões foram superiores em relação aos leitões das fêmeas que não receberam glutamina na dieta. Outro estudo, (WU; MEIER; KNABE, 1996) utilizando diferentes níveis de glutamina (0,0; 0,2; 0,6 e 1%) na dieta de leitões desmamados aos 21 dias de idade, encontraram melhora na eficiência alimentar na segunda semana pós-desmame, com o nível de 1% em relação à dieta controle. Os níveis intermediários não diferiram nas duas semanas estudadas. Este mesmo estudo encontrou menor atrofia jejunal com 1 semana pós-desmame, apresentada pela maior altura de vilosidade nos leitões que receberam 1% de glutamina na dieta em comparação à dieta controle.

Há que ser averiguado, portanto, em primeira instância, a relação desses aminoácidos com o estresse do período que antecede a manifestação do primeiro estro, a posterior ciclicidade até a manifestação do segundo estro e no estro que antecede a primeira inseminação artificial juntamente com a aplicação do flushing nutricional. Num segundo instante, averiguar a relação do aminoácido com o estado corporal da fêmea no momento do parto e lactação subsequente, tendo sido utilizada sua suplementação no terço final da gestação e lactação, preparando mais adequadamente a fêmea nas suas exigências para as fases de gestação e lactação, com reflexos na leitegada. Além disso, a suplementação nos terços inicial e médio da segunda gestação e os efeitos da suplementação no desenvolvimento dos fetos aos 73 dias de idade.

Verificam-se ainda os efeitos no desempenho dos leitões, tanto no aleitamento, uma vez que, nesse período, estudos já demonstraram efeito da glutamina no leite, havendo a necessidade de se avaliar além dessa fase, as posteriores, creche e crescimento e terminação. Particularmente na creche, vários estudos têm demonstrado os efeitos da glutamina, por se tratar de um período estressante para os leitões. Essa ação na manutenção da homogeneidade de desempenho deve ser avaliada em idades mais avançadas, associando ainda aos possíveis diferenciais à imunidade conferida através de vacinas.

CAPÍTULO I

Efeito da Suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico no primeiro ciclo estral e flushing sobre os parâmetros reprodutivos.

3 CAPÍTULO I: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NO PRIMEIRO CICLO ESTRAL E FLUSHING SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS

RESUMO

Dezesseis marrãs foram submetidas a dois tratamentos, grupo suplementado com L-glutamina e L-ácido glutâmico (1% na dieta) e grupo controle sem suplementação, a partir dos 154,8±5,82 dias de idade e 92,16±5,06 kg de peso vivo, até a manifestação do segundo estro e durante o flushing alimentar, antes da primeira inseminação artificial. Foram analisados o peso corporal, ganho de peso, consumo de ração, duração dos estros e ciclos estrais, níveis hormonais (cortisol, progesterona e estradiol) no primeiro ciclo estral, taxa de ovulação e viabilidade embrionária aos 5 dias de gestação. Não foi detectada diferença significativa no peso das marrãs no período considerado, mas a probabilidade das estimativas das variâncias aos 29 e 49 dias de experimento (183,8 e 203,8 dias de idade, respectivamente) foi significativa, representando menor variabilidade para o grupo de fêmeas suplementadas. O grupo suplementado apresentou maior consumo de ração ($p=0,0096$) na primeira semana de experimentação, e a probabilidade das estimativas das variâncias também foi significativa ($p=0,0447$), representando maior homogeneidade para o grupo suplementado. A homogeneidade para o grupo suplementado também foi maior ($p=0,00432$) para a variável ganho de peso no período de 49º ao 5º dia de gestação. Os níveis séricos de cortisol e progesterona foram significativos em função do tempo, representando resposta quadrática os níveis de progesterona ($p<0,05$). As concentrações de estradiol no 1º ciclo estral mostraram tendência à significância para o efeito tempo ($p=0,0643$), havendo resposta quadrática ($p<0,05$). Os parâmetros, taxa de recuperação, número total de células, percentual de célula mortas, percentual de embriões por classe de desenvolvimento (blastocistos eclodido ou expandido, aos 5,69 ± 0,79 de gestação não diferiram estatisticamente. O percentual de células vivas encontradas nos embriões seja significativo quanto às estimativas das variâncias, mostrando maior homogeneidade para o grupo suplementado. Quanto ao número de corpos lúteos ($p>0,05$), embora a diferença tenha sido menor em número corpos lúteos no grupo controle comparado ao suplementado (17,88 e 20,25, respectivamente), representa quase 3

leitões a mais nascidos. Os resultados encontrados da suplementação no flushing indicam nesta fase de interesse, a dinâmica de desenvolvimento folicular diminuindo a heterogeneidade dos folículos com reflexos na taxa de ovulação, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário até 5 dias de gestação com efeito ainda na maior viabilidade, fato este demonstrado pela significativa menor variabilidade quanto às células vivas, o que repercute na produtividade da fêmea.

Palavras chave: Marrã. Glutamina. Glutamato. Flushing. Gestação.

3.1 INTRODUÇÃO

Na cadeia produtiva de suínos, o manejo empregado desde a seleção das marrãs e acompanhamento até o momento da primeira inseminação artificial ou monta vem se tornando uma prioridade para garantir vida útil reprodutiva ideal nas diferentes linhagens hiperprolíficas atuais.

A marrã caracteriza-se uma categoria de grande importância no sistema de produção (MACHADO et al., 2008), substituindo cerca de 40% do plantel de matrizes, e técnicas específicas, como o flushing alimentar, têm influência significativa na produtividade (SANTO, 2012), pois altera os níveis hormonais, afetando a fisiologia reprodutiva da fêmea, podendo provocar aumento no número de ovulações, melhorando a viabilidade embrionária (LAGO et al., 2004).

Um dos desafios na esfera reprodutiva é fazer com que a marrã, que está em crescimento, consiga manter a gestação, seja produtiva em número de leitões e que tenha condições para enfrentar a primeira lactação sem grandes perdas de massa corporal. Por estes motivos, a marrã precisa de maiores cuidados na fase inicial da sua vida reprodutiva.

O tamanho da leitegada é consequência do nível de oócitos viáveis, visto que a produtividade depende do número de nascidos por fêmea, o que corresponde a uma perda econômica para o produtor em seu sistema de produção (FERGUSON et al., 2003).

A nutrição das marrãs tem a característica diferencial em proteínas e aminoácidos para suprir as necessidades de manutenção, crescimento corporal e a primeira gestação, dando

suporte para a época do primeiro catabolismo lactacional, fase em que a marrã pode perder muito peso e comprometer sua vida útil reprodutiva.

Alguns aminoácidos sintéticos complementam a formulação das rações para as marrãs, mas alguns são mais utilizados para a nutrição leitões, como a glutamina e o glutamato, aminoácidos não essenciais, não constando nas tabelas de recomendações como o NRC.

Dentre algumas funções da glutamina, precursora na síntese de nucleotídeos (purinas e pirimidinas), doando nitrogênio, essenciais na proliferação celular, incluindo células embrionárias e trofoblastos (WU, 1998; NEWSHOLME et al., 2003), características importantes para marrãs que estão iniciando a vida reprodutiva.

A hidrólise da glutamina em glutamato pela enzima glutaminase é o mecanismo para a sua utilização no organismo (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

A glutamina tem participação indireta no aumento da secreção de insulina pelo pâncreas, além de ser substrato para as células β (CARPINELLI e XIMENES, 2000), o que poderia de certa forma, aumentar a insulina e conseqüentemente, os parâmetros reprodutivos.

Os objetivos do estudo foram avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina e L-ácido glutâmico, no primeiro ciclo estral e flushing que antecede a primeira inseminação artificial em marrãs, sobre os parâmetros reprodutivos e embriões aos 5 dias de gestação.

3.2 MATERIAL E MÉTODO

A seguir serão descritas as metodologias empregadas para obtenção dos resultados apresentados neste estudo.

3.2.1 Local e instalações

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo 2618/2012).

O experimento foi conduzido na unidade de gestação do Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS), do Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia (VNP/FMVZ), da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga-SP. Essa unidade é constituída de gaiolas individualizadas com oferecimento das dietas através de sistema automático graduado, a fim de tornar acurada a medida de consumo pelas fêmeas, com bebedouros do tipo chupeta. A figura 1 apresenta as fêmeas durante o período experimental na unidade de gestação do LPS.

Figura 1 - Fêmeas na Unidade de Gestação do Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS)



Fonte: Parazzi, 2012.

3.2.2 Animais e preparação

Foram utilizadas 16 marrãs híbridas Agrocercos PIC[®], linhagem Cambrough 25, provenientes da Fazenda Paraíso, Patos de Minas-MG.

Na chegada das marrãs ao Laboratório de pesquisa em Suínos (LPS) estas apresentaram, peso de $92,16 \pm 5,06$ quilos e idade média de $154,8 \pm 5,82$ dias, parâmetros estes considerados pela literatura ideais para a indução do estro (BELTRANENA⁴, 1992, apud PATTERSON, 2001).

O estímulo ao primeiro estro foi através da aplicação de 600 UI de eCG, (Novormon

⁴ BELTRANENA, E. Nutrition and reproductive development in gilts. Ph.D. Thesis. University of Alberta, Canada. p. 22-140.

5000[®], Syntex S.A.) e após 72 horas, 2,5 mg de LH porcino (Lutropin-V[®], Vetrepharm Canada Inc.), ambos pela via intramuscular, acrescido do passeio do macho reprodutor, duas vezes ao dia, 15 minutos/cada. Acompanhando a ciclicidade das marrãs, os estros foram diagnosticados (tempo de duração e número /fêmea).

3.2.3 Alimentação

O manejo alimentar foi constituído de dois tratos diários (7:00 e 15:00 horas) oferecendo-se dieta de reposição (Tabela 1), na quantidade de 2,4 kg por dia desde a chegada dos animais até o terceiro estro. No ciclo estral subsequente houve um período de 5 dias de restrição alimentar de 1,8 kg, aumentando-se em seguida a quantidade para 3,3 kg da dieta de reposição, caracterizando assim o “flushing” alimentar. Após inseminação artificial feita no quarto estro, foi oferecida a ração de gestação na quantidade de 2,0 kg/dia (Tabela 1).

As formulações das rações seguiram as recomendações da empresa (Agroceres[®] Multimix).

Tabela 1 - Ingredientes, níveis nutricionais e níveis de garantia das dietas de reposição, controle e suplementação e da ração de gestação

Ingredientes	Rações de Reposição		Ração de Gestação
	Controle	Suplementação	
Milho Moído	140,00	137,5	190,00
Farelo Soja (46% PB)	62,00	62,00	50,00
Farelo Trigo (16% PB)	36,00	36,00	-
Núcleo Suínos Reposição ¹	10,00	10,00	-
Núcleo Suínos Gestação ²	-	-	10,00
Óleo de soja	2,00	2,00	
Suplementação ³	-	2,5	
Batida	250 Kg	250 kg	250 kg
Níveis Nutricionais			
Matéria Seca (%)	89,01	90,23	89,43
Matéria Mineral (%)	6,16	6,32	5,56
Energia Bruta	3878	3880	3764,5
Extrato Etéreo (%)	4,17	4,12	3,80
Proteína Bruta (%)	17,59	18,46	15,44
Cálcio (%)	0,78	0,80	0,80
Fósforo (%)	0,66	0,65	0,52

¹ **Núcleo Suínos Reposição** (por kg de produto): ác. fólico 48,5 mg; ác. pantotênico 350 mg; Biotina 35,5 mg; cálcio 165 g; cobalto 8 mg; cobre 2500 mg; colina 17 g; ferro 625 mg; fitase 12000 ftu; fósforo 48 g; flúor 500 mg; iodo 35 mg; lisina 8.000 mg; manganês 1.110 mg; niacina 525 mg; selênio 12 mg; sódio 48 g; vit. A 405.000 UI; vit. B1 54 mg; vit. B12 675mcg; vit. B2 126 mg; vit. B6 54 mg; vit. D3 100.000 UI; vit. E 890 UI; vit. K 89 mg; zinco 7.500 mg. ²**Núcleo Suínos Gestação** (por kg de produto): ác. fólico 36 mg; ác. pantotênico 325 mg; biotina 25 mg; cálcio 170 g; cobalto 4 mg; cobre 2500 mg; colina 12 g; ferro 625 mg; fitase 12.500 ftu; fósforo 50 g; flúor 500 mg; iodo 35 mg; manganês 1000 mg; metionina 26,5 g; niacina 487,5 mg; selênio 11,16 mg; sódio 50 g; vit. A 375.000 UI; vit. B1 50 mg; vit. B12 620 mcg; vit. B2 96 mg; vit. B6 50 mg; vit. D3 93.750 UI; vit. E 825 UI; vit. K3 82,5 mg; zinco 1,875 mg. ³**Suplementação**: 10% L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico.

Fonte: Agroceres[®].

3.2.4 Delineamento experimental e tratamentos

As fêmeas foram distribuídas de acordo com o peso nos tratamentos: sem suplementação (Controle) e com suplementação de 1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta (Suplementação), em substituição ao milho, oferecidos a partir da chegada dos animais até a manifestação do segundo estro e durante o flushing que antecedeu a primeira inseminação artificial realizada no quarto estro.

3.2.5 Avaliação de desenvolvimento ponderal

As fêmeas foram pesadas na chegada dos animais, repetindo ao 1º, 2º e 3º estros e no 5º dia de gestação. As mensurações de ganho de peso e consumo de ração, correspondem aos intervalos do início do experimento ao 7º dia, do 8º ao 28º, primeiro ciclo estral; 29º ao 48º dia, segundo ciclo estral; e do 49º dia ao final do experimento aos 5 dias de gestação.

3.2.6 Avaliação hormonal

Para as avaliações dos níveis de progesterona, estradiol e cortisol, o soro sanguíneo foi obtido na chegada das fêmeas até o segundo estro, totalizando 9 colheitas. As colheitas foram feitas duas vezes por semana, as terças e sextas logo após o trato pela manhã.

A contenção dos animais para a colheita de sangue foi conduzida com o auxílio do cachimbo e através de punção da veia jugular com seringa de 20 mL e agulha 40 x 12 gauges, sendo feita a colheita de 20 mL de sangue, as quais foram imediatamente passadas para tubos sem anticoagulantes para obtenção do soro, acondicionados em isopor com gelo. Imediatamente após o término da colheita o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, e divididos em alíquotas. Após identificação com o número do animal e a data da colheita, as amostras foram armazenadas em caixas específicas e congeladas em freezer a -20°C para posterior análise.

Para a realização das análises no Santē Laboratório Veterinário, em Brasília-DF, foi utilizada a técnica da eletroquimioluminescência para os três hormônios. O aparelho utilizado para leitura foi o Elecsys 2010 e os kits System COBAS (cortisol, Progesterone II e Estradiol II), Sistema Roche. As amostras foram analisadas em duplicata e as técnicas segundo o Laboratório de referência, serão descritas a seguir.

O princípio do teste para a determinação do cortisol foi a competição, com duração de 18 minutos. Para tanto, na primeira incubação, 20µL de amostra foram adicionados ao anticorpo biotilado específico para o cortisol e um derivado marcado com complexo de rutênio. Conforme a concentração do analito na amostra e a formação do respectivo complexo

imune, o local de ligação do anticorpo marcado é ocupado em parte com analito de amostra e em parte com hapteno marcado com ruténio.

Na segunda incubação, após a adição das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas foram fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados foram então removidos com ProCell/ProCell M. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

Os resultados foram determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de dois pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente.

No ensaio para a determinação do estradiol, o mesmo princípio foi utilizado, com um anticorpo policlonal direcionado especificamente contra o 17 β -estradiol. O estradiol endógeno liberado da amostra pela mesterolona compete com o derivado de estradiol adicionado, marcado com um complexo de ruténio, para os locais de fixação no anticorpo biotinilado.

Na primeira incubação, com a amostra (35 μ L) e um anticorpo biotinilado específico para estradiol, formou-se um imunocomplexo, cuja quantidade depende da concentração de analito na amostra. Na segunda incubação, após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina e de um derivado de estradiol marcado com um complexo de ruténio, os locais ainda vazios dos anticorpos biotinilados foram ocupados, formando-se um complexo com anticorpo. O complexo formado ligou-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura de reação foi aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas foram fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados foram removidos com ProCell/ProCell M. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induziu uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

Os resultados foram determinados da mesma maneira realizada para o cortisol.

Na determinação da progesterona, o princípio do teste também foi o de competição, com duração de 18 minutos.

Na primeira incubação, 30 μ L da amostra na presença de um anticorpo biotinilado monoclonal específico para progesterona e de um derivado de progesterona marcado com complexo de ruténio foram incubados com Danazol para a libertação da progesterona. A

progesterona da amostra compete então, com o derivado de progesterona marcado pelos locais de ligação do anticorpo.

Na segunda incubação, após a adição das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado ligou-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina. A quantidade de derivado de progesterona marcado fixado à fase sólida foi inversamente proporcional ao teor de progesterona na amostra.

A mistura de reação foi aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas foram fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados foram então removidos com ProCell/ProCell M. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados foram determinados da mesma maneira realizada para o cortisol.

3.2.7 Taxa de ovulação e viabilidade embrionária

A colheita dos embriões utilizada foi realizada de acordo com a metodologia empregada pelo LPS em parceria com Laboratório de Fecundação In Vitro, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. Aos $5,69 \pm 0,79$ dias de gestação, procedeu-se o abate para avaliação dos embriões e do ovário (taxa de ovulação).

Na análise dos embriões, avaliaram-se os seguintes parâmetros: taxa de recuperação, número total de células, percentual de células vivas, percentual de célula mortas e percentual de embriões por classe de desenvolvimento (blastocistos eclodido ou expandido).

O abate das fêmeas foi realizado de acordo com as normas de bioética e o método utilizado consistiu na eletronarcose, sendo nesse momento introduzida na cérvix uma pipeta de inseminação artificial, visando evitar o refluxo de urina para o interior do útero e possíveis danos à integridade dos embriões. O processo de retirada do aparelho reprodutivo se deu logo após a sangria, através de uma incisão de aproximadamente 10 centímetros sobre a linha branca na região inguinal, sendo seguida de sutura da musculatura, tecidos adjacentes e pele, permitindo que a carcaça continuasse na linha de abate. O conjunto composto por útero, ovidutos e ovários foi acondicionado em sacos plásticos identificados e transportados dentro de isopor para o LPS, onde os cornos uterinos e ovidutos foram preparados e os ovários

retirados. Os cornos uterinos foram suspensos, sendo fixados pela região do corpo uterino, permitindo a injeção com auxílio de sonda plástica de 10 mL de solução tampão fosfato (phosphate buffered solution, PBS) suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) aquecida (38°C) no infundíbulo do oviduto. O conteúdo líquido do oviduto foi dirigido para o corno uterino, sendo o oviduto removido com um corte na junção útero-tubárica. No local da incisão foram injetados 40 mL de PBS com SBF aquecido, sendo duas pinças hemostáticas posicionadas na junção útero-tubárica de forma a deixar um orifício para a drenagem do lavado uterino. Antes de escoar o líquido, os cornos foram movimentados verticalmente alternando suas extremidades (junção útero-tubárica e porção caudal) para completa lavagem do corno. O lavado foi acondicionado em tubos falcon de 50 mL previamente identificados e observado em estereomicroscópio para recuperação dos embriões (aumento de 20x). Até o início da coloração, os embriões recuperados foram mantidos em meio TCM 199 acrescido de 3mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) sobre placa aquecida (38°C). Durante a recuperação dos embriões estes foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário. Os embriões obtidos foram lavados 3 vezes em PBS e incubados por 10 minutos em solução contendo duas sondas fluorescentes, a saber, 5 mg/mL de Hoechst 33342, para avaliação do número de células totais, e 10µg/mL de Iodeto de Propídio, para avaliação do número de células mortas. Os embriões foram lavados e colocados entre lâmina e lamínula com glicerol e avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus), sendo utilizados filtros de acordo com a marcação utilizada: Hoechst 33342, de excitação máxima de 355nm e emissão máxima de 465nm, e Iodeto de Propídio, de excitação máxima de 530nm e emissão máxima de 615nm. Para a avaliação da viabilidade embrionária foi realizada a razão entre células mortas e células totais.

As análises referentes aos embriões foram avaliadas no Laboratório de Fecundação In Vitro, Clonagem e Transgenia Animal da FMVZ/USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antônio Visintin.

Figura 2- Recuperação e observação dos embriões



Fonte: Parazzi, 2012.

3.2.8 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em função do peso, sendo a unidade experimental a fêmea.

As premissas da análise estatística foram verificadas quanto à normalidade dos resíduos, pelo teste do Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e homogeneidade das variâncias. As variáveis de desempenho, peso, ganho de peso médio diário, peso dos ovários, números de corpos lúteos, peso útero, percentagem de células totais, vivas e mortas, percentual de recuperação dos embriões e parâmetros hormonais, foram submetidas à análise de variância, através do PROC MIXED do SAS, considerando o tratamento como efeito fixo e bloco como efeito aleatório. O efeito significativo das variáveis hormonais foram analisadas através de análise de regressão.

Os dados foram analisados pelo programa SAS 9.2 (2002-2008). O nível de significância considerado foi de 5%. Posteriormente, foram analisadas as variabilidades de algumas características, pelo teste “F”.

3.3 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos: peso corporal, consumo de ração e ganho de peso das marrãs durante o período experimental; análises hormonais no primeiro ciclo estral e avaliações dos embriões aos 5 dias de gestação.

3.3.1 Desempenho ponderal e ciclicidade no período pós-púbere

A tabela 2 apresenta as médias e desvio padrão, na duração dos estros (em horas) e ciclos estrais (dias) até o 4º estro, de acordo com os tratamentos, não se observando diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) havendo maior valor do primeiro ciclo estral ($p=0,0781$), com menor variabilidade do grupo suplementado em comparação ao controle. As demais diferenças relacionaram-se às variabilidades na duração dos estros, observando-se menores percentuais no coeficiente de variação do grupo suplementado ocorrido no 2º e 3º estros, associado ao menor valor numérico da duração.

Tabela 2 - Médias e desvio padrão, da duração dos estros (em horas) e dos ciclos estrais (dias) de acordo com os tratamentos

Ciclos	TRATAMENTOS		Probabilidade
	Controle (n=8)	Suplementação (n=8)	
1º estro (horas)	54,86 ± 6,41	48,00 ± 11,11	0,1783
1º ciclo estral (dias)	20,14 ± 1,21	20,83 ± 0,75	0,0781
2º estro (horas)	57,00 ± 13,98	53,14 ± 9,44	0,5494
2º ciclo estral (dias)	20,38 ± 0,74	20,29 ± 0,95	0,8418
3º estro (horas)	60,00 ± 12,83	55,50 ± 8,93	0,4301
3º ciclo estral (dias)	19,63 ± 0,92	19,57 ± 1,27	0,9263
4º estro (horas)	48,00 ± 11,11	48,00 ± 9,07	1,0000

Fonte: Parazzi, 2014.

Na chegada das fêmeas ao LPS, os valores médios iniciais de idade e peso registrados foram de $154,85 \pm 5,82$ dias e $92,16 \pm 5,06$ quilos, respectivamente, vindo a demonstrar pelos valores dos desvios, o nível de homogeneidade dos animais para a aplicação dos tratamentos.

A tabela 3 apresenta os dados de peso médio das fêmeas relativo ao início do experimento, ao 7º dia, 29º e 49º dia de experimento e ao término com o abate das fêmeas ao 5º dia de gestação. As pesagens ao 7º dia caracterizaram o término da maioria das manifestações do primeiro estro, ao 29º dia ao término das manifestações do 2º estro e ao 49º dia ao término das manifestações do 3º estro.

Através dos valores observados na tabela 3, não foram identificadas diferenças significativas entre os tratamentos nas características avaliadas. Na análise das estimativas das variâncias verificou-se diferença significativa no peso aos 29 e 49 dias ($p < 0,05$) que evidenciou a menor variabilidade no grupo suplementado.

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão do peso médio (kg) das fêmeas, ao início do experimento, ao 7º, 29º e 49º dia de experimento e ao 5º dia de gestação

	Tratamentos		Probabilidades	
	Controle (n=8)	Suplementação (n=8)	P	P das variâncias
Início experimento	92,63 ± 5,91	91,69 ± 4,39	0,9999	0,4501
7 dias	101,25 ± 6,51	99,19 ± 3,37	0,5106	0,1048
29 dias	105,5 ± 7,77	105,75 ± 2,88	0,8176	0,0178
49 dias	118,75 ± 11,82	120,94 ± 1,83	0,5900	0,0444
Fim exp (5º dia gest)	130,94 ± 7,99	131,44 ± 2,34	0,6332	0,6326

Fonte: Parazzi, 2014.

Os valores encontrados em relação ao ganho de peso médio diário, mostrados na tabela 4 não mostraram significância. Na análise das estimativas das variâncias destacou-se diferença significativa ($p < 0,05$) de 49 dias ao 5º dia de gestação, conferindo maior homogeneidade ao grupo suplementado.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão do ganho de peso médio diário (kg) das fêmeas, do início do experimento ao 7º dia, 8º ao 28º dias, do 29º ao 48º dia e 49º ao 5º dia de gestação

	Tratamentos		Probabilidades	
	Controle (n=8)	Suplementação (n=8)	P	P das variâncias
Início do experimento ao 7º dia	1,23 ± 0,52	1,07 ± 0,48	0,5160	0,8382
8º ao 28º	0,21 ± 0,19	0,31 ± 0,19	0,3001	0,9571
29º ao 48º	0,63 ± 0,38	0,72 ± 0,33	0,6133	0,7012
49º dia 5º dia de gestação	0,50 ± 0,37	0,42 ± 0,16	0,5708	0,0432

Fonte: Parazzi, 2014.

A tabela 5 apresenta os valores do consumo de ração médio diário, nos períodos constantes para o ganho de peso. Os valores encontrados, não foram significativos, a exceção do período inicial até a manifestação do primeiro estro, em que os animais suplementados consumiram maior quantidade de ração comparado ao controle ($p < 0,05$), acompanhado da menor variabilidade, a qual mostrou na análise das estimativas das variâncias, diferença significativa ($p=0,0447$).

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão do consumo de ração médio diário (gramas) das fêmeas, da chegada ao 7º dia, 8º ao 28º dias, do 29º ao 48º dia e 49º ao 5º dia de gestação

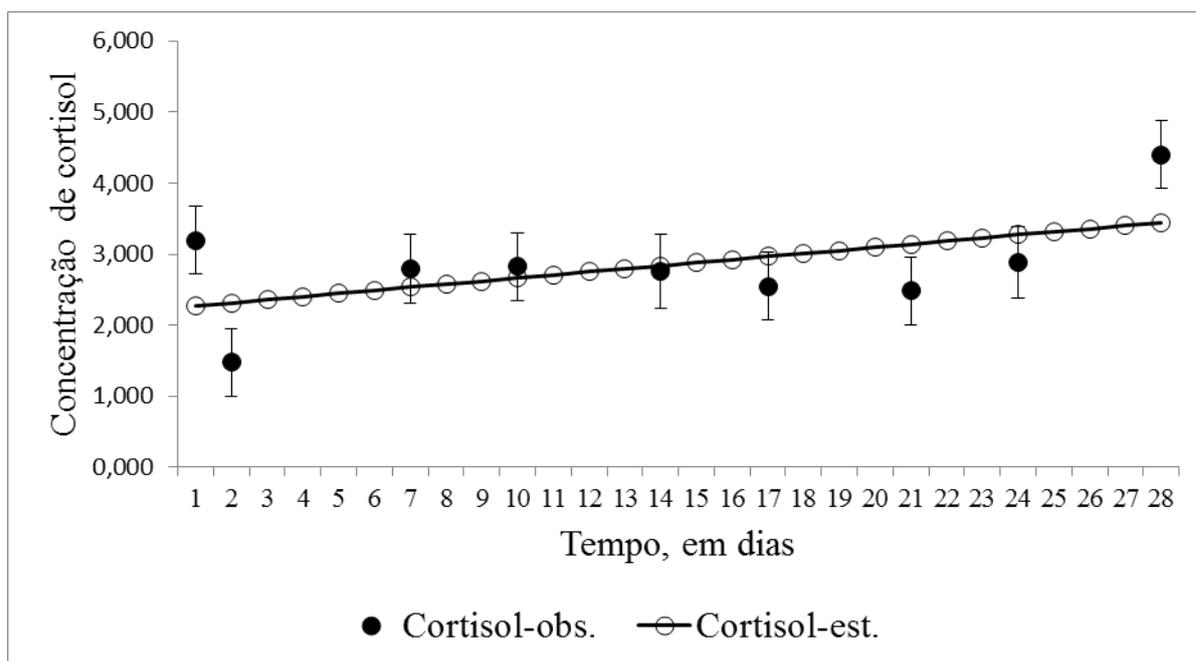
	Tratamentos		Probabilidades	
	Controle (n=8)	Suplementação (n=8)	P	P das variâncias
Início ao 7º dia	1293,7 ± 81,23	1379,7 ± 32,89	0,0096	0,0447
7º ao 28º	2169,61 ± 72,16	2123,09 ± 85,53	0,2247	0,6650
29º ao 48º	2256,54 ± 81,45	2230,24 ± 122,01	0,6200	0,3083
49º dia 5º dia de gestação	2797,26 ± 174,53	2688,46 ± 170,74	0,2276	0,9553

Fonte: Parazzi, 2014.

As análises séricas de cortisol, progesterona e estradiol foram representados nas figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

Na análise de variância dos dados referentes ao cortisol, os efeitos para o tratamento ($p=0,7260$) e a interação tempo e tratamento ($p=0,5000$) não foram significativas, já o efeito tempo (em dias) foi significativo ($p=0,0157$). No desdobramento do efeito tempo, houve regressão linear significativa ($p=0,0192$). O gráfico da regressão foi representado na figura 3.

Figura 3 - Níveis de cortisol em µg/dL dos tratamentos nos dias representados pelo 1º ciclo estral

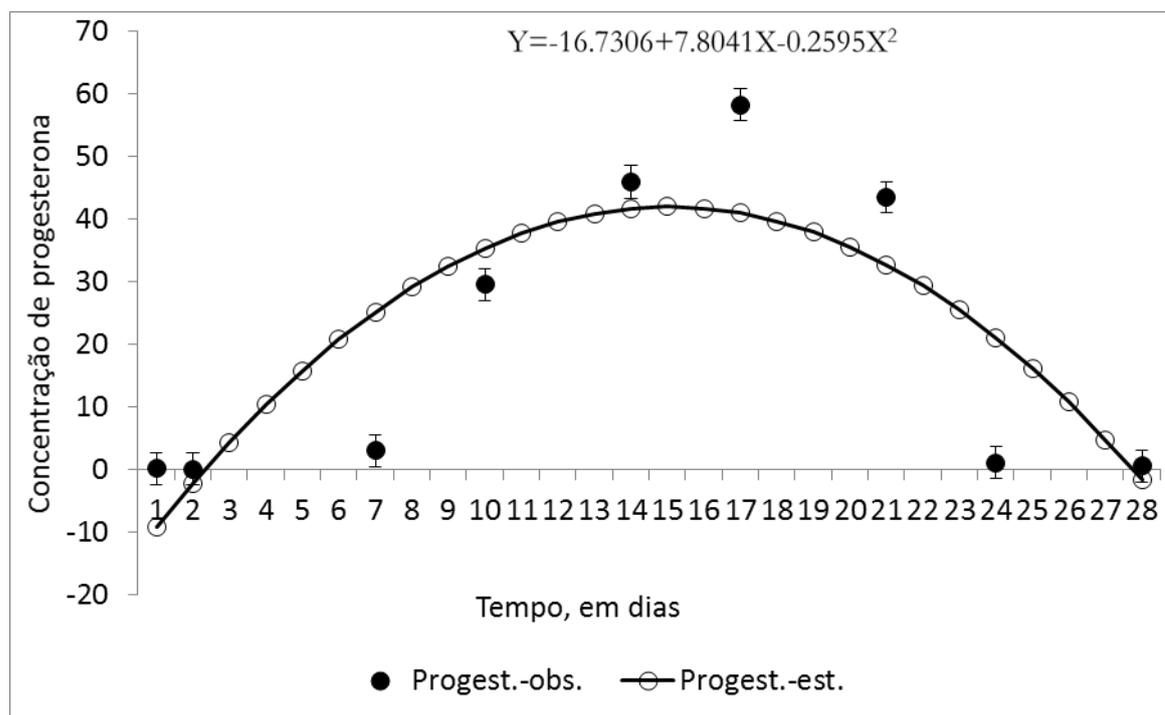


Fonte: Parazzi, 2014.

As figuras 4 e 5 mostram a evolução dos níveis de progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL) ao longo dos 27 dias, representando o 1º ciclo estral das fêmeas.

Na análise de variância dos dados referentes aos níveis de progesterona, os efeitos para o tratamento ($p=0,0892$) e a interação tempo e tratamento ($p=0,1385$) não foram significativas, já o efeito tempo (em dias) foi significativo ($p<.0001$). No desdobramento do efeito tempo, houve regressão quadrática significativa ($p<.0001$). O gráfico da regressão foi representado na figura 4, onde a equação foi $Y=-16.7306+7.8041X-0.2595X^2$, sendo X é o número de dias.

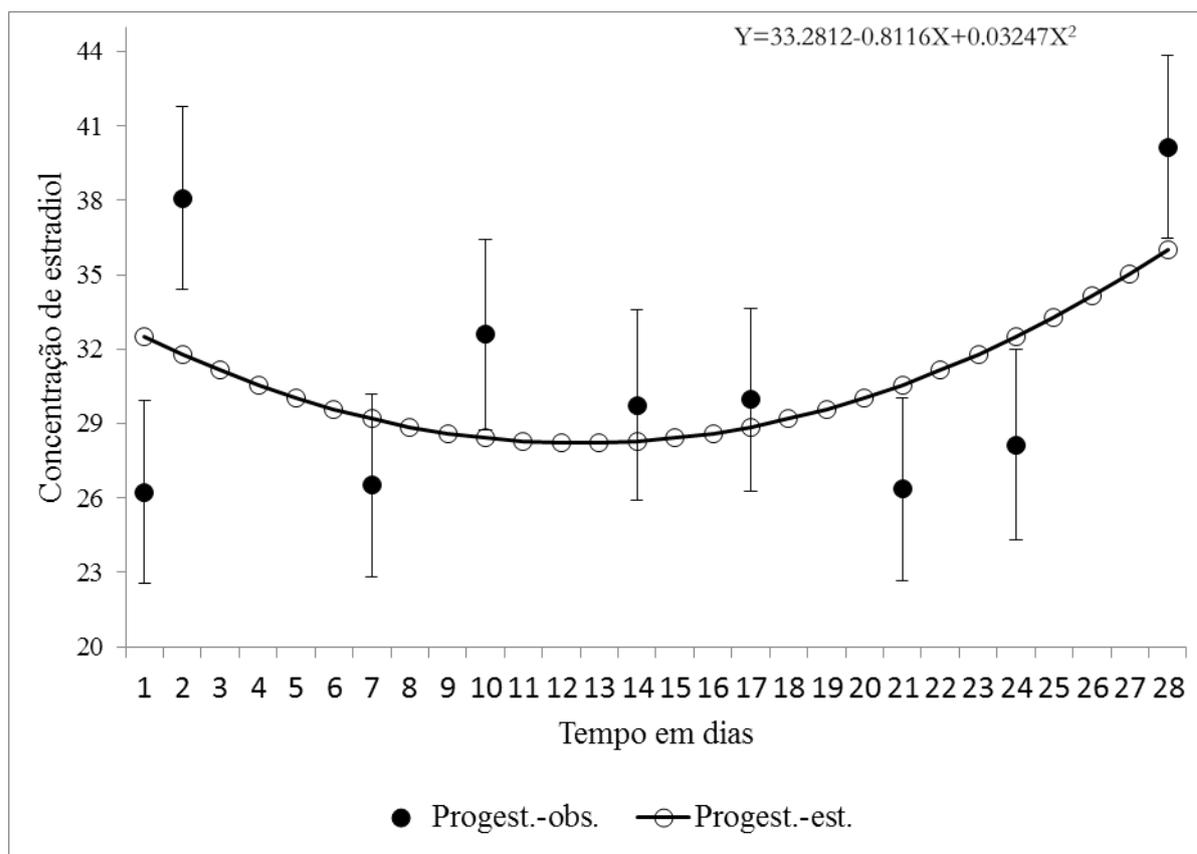
Figura 4 - Níveis de progesterona (ng/mL) dos tratamentos nos dias representados pelo 1º ciclo estral



Fonte: Parazzi, 2014.

Na análise de variância dos dados referentes aos níveis de estradiol, os efeitos para o tratamento ($p=0,3821$) e a interação tempo e tratamento ($p=0,9050$) não foram significativas, já o efeito tempo (dias), a probabilidade foi perto da significância ($p=0,0643$). No desdobramento da tendência ao efeito tempo, houve regressão quadrática perto da significância ($p=0,0740$). O gráfico da regressão foi representado na figura 5, onde a equação foi $Y=33.2812-0.8116X+0.03247X^2$, sendo X é o número de dias.

Figura 5 - Níveis de estradiol (pg/mL) dos tratamentos nos dias representados pelo 1º ciclo estral



Fonte: Parazzi, 2014.

3.3.2 Avaliação dos embriões

Na tabela 6 são observados os valores referentes ao peso do útero, número de corpos lúteos, percentual de células vivas e mortas, taxa de embriões recuperados, percentual de blastocistos, de blastocistos expandidos e eclodidos. Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos em nenhuma das características analisadas.

Na análise das estimativas das variâncias houve significância no percentual de células vivas ($p=0,0188$) aliado a menor variabilidade, indicando a maior homogeneidade dos dados no grupo suplementado. O percentual numérico de células mortas foi menor em comparação com o controle, além da observância da caracterização das estruturas celulares que mostraram maior igualdade de distribuição, indo de encontro a homogeneidade de resposta do grupo suplementado.

O número de corpos lúteos encontrados, embora não significativos, mostraram superioridade para o grupo suplementado, onde poderia representar quase 3 leitões a mais, representando um tamanho de leitegada maior ao nascimento.

Tabela 6 - Médias e desvios padrão do peso do aparelho reprodutor (kg), número de corpos lúteos, percentagem de células vivas, de mortas, taxa de embriões recuperados (embriões rec), percentual de blastocistos (blast), blastocistos expandidos e eclodidos

Variáveis	Tratamentos		Probabilidades	
	Controle (n=8)	Suplementação (n=8)	P	P das variâncias
Peso do útero	600,65 ± 77,48	557,68 ± 86,66	0,1990	0,7752
Corpos lúteos	17,88 ± 3,27	20,25 ± 3,78	0,2251	0,7171
Células vivas	93,35 ± 8,41	97,73 ± 2,54	0,2482	0,0188
Células mortas	12,98 ± 14,30	7,34 ± 11,23	0,4850	0,5721
Embriões rec	88,43 ± 14,10	94,43 ± 10,51	0,3204	0,6072
Blastocistos	19,20 ± 28,42	31,42 ± 47,41	0,9337	0,6470
Blast expandidos	45,20 ± 39,27	32,02 ± 44,31	0,5669	0,7769
Blast eclodidos	33,92 ± 47,127	35,35 ± 45,65	0,9693	0,9672

Fonte: Parazzi, 2014.

3.4 DISCUSSÃO

Diante da sequência de utilização da suplementação com L-glutamina e L-ácido glutâmico comparado com o controle, uma avaliação interativa dos parâmetros requer atenção especial, pois, estamos trabalhando com aminoácidos não essenciais, mas que em condição de estresse do animal pode tornar-se essencial (glutamina), aliado às inúmeras outras funções no metabolismo celular, tanto da glutamina como do glutamato. No estudo foi destacado no peso das marrãs, maior homogeneidade do grupo suplementado durante o período experimental, pelos valores das estimativas das variâncias significativas aos 29 e 49 dias de experimentação. Esse padrão de peso se manteve até o final do experimento.

O consumo de ração na primeira semana foi significativamente ($p=0,0096$), maior para o grupo suplementado, associado a maior homogeneidade nesse período, em que as fêmeas se encontram em fase de adaptação à nova instalação, o que refletiu nos níveis mais elevados de

cortisol. O transporte dos animais para o laboratório é um momento estressante, uma vez que existe o estresse da viagem e a adaptação ao novo local.

Alterações no organismo como resposta fisiológica ao estresse ocorrem, quando o organismo busca a adaptar-se, podendo haver no prolongamento do fator estressante, algumas respostas negativas de ordem produtiva, reprodutiva ou comportamental (ALVARENGA et al., 2011). As concentrações séricas de cortisol mantiveram um padrão desde a chegada das fêmeas ao LPS, mas que aumentou ligeiramente ao longo do tempo, conforme ocorriam as coletas de sangue. A individualidade das fêmeas é importante, visto que, a capacidade de adaptação é uma característica que pode variar de um indivíduo para outro, principalmente dada a homogeneidade dos animais nos tratamentos.

Durante a manifestação dos estros, o consumo foi variado entre os tratamentos, o que refletiu a individualidade das fêmeas também na manifestação do comportamento de estro, causando diferenças no consumo de ração, pois, algumas fêmeas diminuíram o consumo quando estavam em estro.

No estresse, há aumento da glutamina intracelular, e conseqüentemente pode aumentar a degradação de proteína, pois o organismo está precisando e a síntese é menor no músculo esquelético (NEWSHOLME, 2001). No estresse agudo, os níveis plasmáticos de cortisol aumentam, podendo aumentar a gliconeogênese e a degradação proteica (MOINARD et al., 1999).

Pelos níveis de cortisol observados, não houve influência da suplementação com glutamina e glutamato.

As avaliações das concentrações séricas de progesterona mostraram-se, durante o primeiro ciclo das fêmeas, com perfil esperado havendo significância em relação ao tempo ($p < 0,0001$), observando-se comportamento normal durante o período do ciclo estral.

A utilização do flushing alimentar na suinocultura é praticada nas granjas visando aumentar o tamanho da leitegada no primeiro parto, justamente porque estudos demonstram sua ação no aumento da taxa de ovulação e melhora na viabilidade do embrião (LAGO, 2003; ECKHARDT, 2009).

O aporte nutricional no flushing pode modificar, portanto os parâmetros hormonais e conseqüentemente os índices reprodutivos, melhorando a ovulação e assim maior número de leitões. Assim, fêmeas com maior consumo de ração podem metabolizar esteróides mais facilmente (FERGUSON et al., 2003). A diminuição de esteróides circulantes poderia resultar em feedback negativo no eixo hipotálamo-hipofisário e levar a um aumento nas

gonadotrofinas que modulariam o crescimento folicular (FERGUSON et al., 2003). Alguns estudos (BOOTH; COSGROVE; FOXCROFT, 1996; FLOWERS et al., 1989) demonstraram aumento nos níveis de LH, assim como de insulina, após período de restrição alimentar acompanhado do posterior oferecimento de maior quantidade de alimento durante o ciclo estral, o que resulta na melhora da taxa de ovulação.

O eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal controla a função ovariana, já a insulina regula o desenvolvimento e a maturação dos folículos (CHAVES et al., 2011), e é produzida pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas (SHULDINER⁶ et al., 1998, apud CHAVES, et al., 2011), e tem importante ação nos ovários, como desenvolvimento folicular, maturação dos oócitos e no desenvolvimento embrionário (YASEEN et al., 2001).

A detecção de receptores para a insulina nos ovários sugere que possa ser mediador dos efeitos da nutrição na reprodução, podendo alterar a foliculogênese (YASEEN et al., 2001; CHAVES, et al., 2011; CORTEZ; TONIOLLI, 2012). A secreção de gonadotrofinas pelo eixo hipotálamo-hipófise podem ser influenciadas pela insulina e o cortisol (CORTEZ e TONIOLLI, 2012).

A glutamina é substrato para as células β do pâncreas, mas aliado a leucina ou a um análogo químico não metabolizável da leucina (por exemplo o BCH, 2-aminobíciclo-[2,2,1]-heptano-2-carboxílico), aumenta a produção de ATP e desencadeia o processo de secreção da insulina (CARPINELLI e XIMENES, 2000; SENER E MALAISSE, 1980; MALAISSE et al., 1982a; MALAISSE et al., 1982b). Nesse processo foi observado aumento da desaminação da glutamina e do glutamato. A enzima glutaminase parece aumentar pelo incremento da glutamina para a célula, porém, o aumento da concentração do glutamato e a estimulação do BCH pela glutamato desidrogenase promovem elevação do 2-oxoglutarato, que inibe a enzima glutaminase (CARPINELLI e XIMENES, 2000; MALAISSE et al., 1982b).

A suplementação com glutamina e glutamato no flushing pode desta feita, ter influenciado no aumento da secreção de insulina indiretamente e esta ter levado ao maior valor numérico da taxa de ovulação encontrada no estudo nas marrãs suplementadas. Do mesmo modo que a ação poderia ser feita nas células de crescimento rápido como é o caso das células foliculares no período do ciclo estral antes da ovulação, tendo também a ação hormonal já citada pelo efeito da insulina.

⁶ Shuldiner A.R., Barbetti F., Raben N., Scavo L. & Serrano J. Insulin. In: Leroith, D. Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects. CRC Press, Boca Raton, 1998, p. 181-219

A L-glutamina ainda é citada como importante na proliferação celular, além de enterócitos e células do sistema imune, de células embrionárias e trofoblastos, já que é precursora na síntese de purinas e pirimidinas (WU, 1998).

A presença de glutamina nos líquidos fetais, embriões ou fetos, e ainda na placenta, têm sido estudados pela quantidade deste aminoácido encontrado no leite (WU; BAZER; WENBIN, 1995; WU; MEIER; KNABE, 1996; SELF et al., 2004).

Petters et al. (1990) testaram algumas fontes de energia para embriões (1 a 2 células) de suínos *in vitro*, como glicose, fosfato e glutamina. Os autores concluíram que a glicose e a glutamina, juntas ou isoladas, foram boas fontes de energia para os embriões em desenvolvimento.

A glutamina mostra a sua capacidade em substituir a glicose como fonte de carbono para a produção de energia no desenvolvimento do embrião, mesmo na ausência de glicose (PETTERS et al., 1990).

Rosenkrans; Davis e Milliken (1989) também encontram benefícios com a glutamina, e encontraram melhor desenvolvimento dos blastocistos de suínos.

Na avaliação dos embriões dois dados mostraram-se interessantes, um deles ligado ao maior percentual numérico de células vivas com significância para as estimativas das variâncias, o que leva a conduzir para a menor variabilidade dos dados do grupo suplementado. O outro ponto foi o maior número de corpos lúteos do grupo suplementado, apesar da não significância, mas que vem associar-se aos outros efeitos e pode representar, ações no metabolismo com respostas em termos de produção de leitões nascidos, um parâmetro diferencial em sistemas de produção, refletindo no caso quase 3 leitões a mais ao nascimento por fêmea.

Aliado a essa diferença numérica nessa característica, alertamos para a qualidade e a homogeneidade dos animais, pois, o grupo controle obteve um resultado similar ao grupo suplementado condizente com os dados de fêmeas hiperprolíficas atuais.

A característica células mortas mostrou numericamente valor inferior com menor variabilidade no grupo suplementado, acompanhado do maior valor na taxa de recuperação e mais homogeneidade quanto às estruturas em percentuais dos blastocistos, blastocistos expandidos e eclodidos, havendo assim a suspeita de que esses parâmetros em conjunto, poderiam significar menor heterogeneidade de desenvolvimento dos oócitos após fertilização, considerando o desenvolvimento inicial dos embriões até fase de blastocisto.

Os resultados com a aplicação do flushing aliado a suplementação, evidenciou uma melhora na taxa de ovulação, o que poderia ter sido potencializada se a suplementação tivesse continuado a partir da inseminação até o quinto dia de gestação, dada as características da glutamina na síntese de nucleotídeos importantes para o embrião na fase inicial.

As diversas funções da glutamina e glutamato têm sido descritas na literatura com uso para fêmeas em gestação, lactação ou leitões na creche, mas pouco citado em fêmeas na puberdade, portanto, o estudo trouxe nova perspectiva ao uso para fêmeas principalmente no flushing, com resultados que precisam ser melhor estudados em relação aos parâmetros hormonais e viabilidade embrionária.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultado encontrado sobre a taxa de ovulação das fêmeas foi indicativo de que a suplementação possa ter influenciado os parâmetros hormonais reprodutivos através do estímulo da secreção de insulina indiretamente, assim como, importante na síntese de nucleotídeos, principalmente células de crescimento rápido como as células foliculares e trofoblastos no desenvolvimento das estruturas embrionárias.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. L. N.; ZANGERONIMO, M. G.; OBERLENDER, G.; MURGA, L. D. S. Aspectos reprodutivos e estresse na espécie suína. **Boletim Técnico**, n. 86, p. 1–40, 2011.

BOOTH, P. J., COSGROVE, J. R.; FOXCROF, G. R. Endocrine and metabolic responses to realimentation in feed-restricted prepubertal gilts: associations among gonadotropins, metabolic hormones, glucose, and uteroovarian development. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 840–848, 1996.

CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.; FIGUEIREDO, J. R. Implicações da insulina na função ovariana e desenvolvimento embrionário. **Acta Veterinaria**, v. 5, n. 2, p. 136–146, 2011.

CORTEZ, A. A.; TONIOLLI, R. Aspectos fisiológicos e hormonais da foliculogênese e ovulação em suínos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 163–173, 2012.

CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina : Aspectos bioquímicos , metabólicos , moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 392–397, 2009.

CARPINELLI, A. R.; XIMENES, H. M. A. Importância da glutamina no processo de secreção da insulina. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap 8, 149-154.

FERGUSON, E. M.; ASHWORTH, C. J.; EDWARDS, S. A; HAWKINS, N.; HEPBURN, N.; HUNTER, M.G. Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 61–71, 2003.

ECKHARDT, O. H. O. **Estudo de desempenho reprodutivo e perfil metabólico de fêmeas suínas primíparas submetidas a manejos nutricionais diferenciados aliados ao emprego de gonadotrofinas exógenas**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

FLOWERS, B.; MARTIN, M. J.; CANTLEY, T. C.; DAY, B. N. Endocrine changes associated with a dietary-induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts. **Jornal Animal Science**, v. 67, p. 771–778, 1989

GAMA, R. D. **Emprego de diferentes doses de LH suíno na indução e sincronização da puberdade em marrãs.** 2003. 68 f. Dissertação (Mestre em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LAGO, V. **Estudo dos efeitos combinados de gonadotrofinas e flushing em marrãs à puberdade.** Dissertação (Mestre em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LAGO, V.; VIANNA, W. L.; GAMA, R. D.; ROSSETO, A. C.; PINESE, M. E.; MORETTI, A. S. Sincronização hormonal de estro e “flushing” alimentar em marrãs pós-púberes. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., 2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2004. p. 312.

MACHADO, G. S.; FONTES, D. O.; ALMEIDA, F. R. C. L.; BORGES, A. L. C. C.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, V. F.; SILVA, T. C. T. Efeitos de diferentes fontes de energia sobre taxa ovulatória, fertilidade e sobrevivência embrionária em marrãs cíclicas. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 600–606, 2008.

MALAISSÉ-LAGAE, F.; SENER, A.; MALAISSÉ-LAGAE, F.; WELSH, M.; MATTEWS, D. E.; BIER, D. M.; HELLESTROM, C. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: metabolic response of pancreatic islets to l-glutamine and l-leucine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 15, p. 8731–8737, 1982a.

MALAISSÉ-LAGAE, F.; SENER, A.; GARCIA-MORALES, P.; VALVERDE, I.; MALAISSÉ, W. J. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: influence of a nonmetabolized analog of leucine on the metabolism of glutamine in pancreatic islets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 3754–3758, 1982b.

MOINARD, C.; CHAUVEAU, B.; WALRAND, S.; FELGINES, C.; CHASSAGNE, J.; CALDEFIE, F.; CYNOBER, L. A.; VASSON, M. P. Phagocyte functions in stressed rats: comparison of modulation by glutamine, arginine and ornithine 2-oxoglutarate. **Clinical Science**, v. 97, n. 1, p. 59–65, 1999.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **The Journal of Nutrition**, p. 2515–2522, 2001.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PHITON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153–63, 2003.

REEDS, B. P.; BURRIN, D. Glutamine metabolism: nutritional and clinical significance. glutamine and the bowel. **Journal of Nutrition**, v.131: 2505S–2508S, 2001.

PATTERSON, J. L. **Factors influencing onset of puberty in gilts**. 2001.140p. Thesis (Master of Aciencie) - University of Alberta, Alberta, 2001.

PETTERS, R. M.; JOHNSON, B. H.; REED, M. L.; ARCHIBONG, A. E. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, n. 1, p. 269–75, 1990.

ROSENKRANS, J. C. F.; DAVIS, D. L.; MILLIKEN, G. Pig blastocyst development in vitro is affected by amino acids. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 1503–1508, 1989.

SANTO, T. A. **Puberdade e a vida útil reprodutiva das fêmeas suínas**. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

SAS STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS: Software**. Versão 9.2. Cary: SAS Institute, 2002-2008.

SELF, J. T.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A;HU, J.; BAZER, F. W.; WU, G. Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1444–51, 2004.

SENER, A.; MALAISSE, W. J. L-leucine and nonmetabolized analogue activate dehydrogenase. **Nature**, v. 288, p. 187–89, 1980.

SILVA, C. C. **Efeito das fontes de zinco na dieta de matrizes suínas e na sua progênie**. 2014. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

WU, G.; BAZER, F. W.; WENBIN, T. Developmental changes of free amino acid concentrations in fetal fluids of pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2859–2868, 1995.

WU, G.; MEIER, S. A.; KNABE, D. A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2578–2584, 1996.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249–1252, 1998.

YASSEN, M.A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction**, v.122, p. 601–610, 2001.

CAPÍTULO II

Efeito da Suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de primíparas no final da gestação e lactação e desempenho reprodutivo na gestação subsequente.

4 CAPÍTULO II: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA DE PRIMÍPARAS NO FINAL DA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO E DESEMPENHO REPRODUTIVO NA GESTAÇÃO SUBSEQUENTE

RESUMO

O estudo teve como objetivos avaliar o desempenho produtivo e reprodutivo de primíparas suplementadas com L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta, a partir de 75 dias de gestação, seguindo-se pela lactação, intervalo desmame estro, até os 73 dias da gestação subsequente. As fêmeas foram distribuídas em grupo suplementado (1% na dieta) e controle (sem suplementação), num delineamento em blocos casualizados de acordo com o peso. O peso corporal e a espessura de toucinho (ET) dos 75 dias de gestação até o parto e lactação não foram significativos entre os tratamentos. O número de nascidos foi significativamente maior no grupo controle ($p < 0,05$), comparado ao grupo suplementado. O peso dos leitões e o ganho de peso ao nascimento e durante a lactação não diferiram. A perda de leitões no aleitamento mostrou diferença ($p = 0,0003$), a favor do grupo suplementado, indicando maior sobrevivência comparada com o grupo controle (14,04 e 3,17 versus, respectivamente). As concentrações de glutamina e glutamato no plasma das fêmeas no final da gestação e até o parto, foram significativos para o tratameto e o tempo ($p < 0,05$), indicando valores superiores para o grupo suplementado, já os valores na lactação, colostro, leite e líquidos fetais, não foram significativos ($p > 0,05$). Houve valor próximo da significância para o peso dos fetos aos 73 dias da segunda gestação ($p = 0,0698$), os quais foram mais pesados no grupo suplementado, sugerindo influência da suplementação no início e meio da gestação. As variabilidades dos números de fetos no corno uterino direito e no total foram significativas ($p < 0,05$), evidenciando maior homogeneidade para o grupo suplementado. A suplementação para as fêmeas na lactação pode aumentar a sobrevivência dos leitões na maternidade, e durante os terços inicial e médio da gestação, contribuindo para o desenvolvimento e na homogeneidade no peso dos fetos.

Palavras chave: Glutamina. Glutamato. Gestação. Lactação. Fetos.

4.1 INTRODUÇÃO

A crescente evolução do melhoramento genético nos suínos tem influenciado mudanças nos programas sanitários, reprodutivo e nutricionais, na dinâmica interativa do sistema de produção, com o conseqüente aperfeiçoamento da eficiência produtiva e reprodutiva da matriz. As exigências nutricionais das fêmeas hiperprolíficas atuais são discutidas, principalmente no quesito proteína, tendo a disponibilidade do uso de aminoácidos sintéticos nas dietas para a real adequação ao potencial genético do animal.

A glutamina tem característica particular, pois, é aminoácido não essencial, mas torna-se essencial, em situações de catabolismo diferenciado, como ocorre na lactação, justificando assim sua suplementação. O organismo a sintetiza de acordo com sua necessidade, vindo a ser precursor de outros aminoácidos essenciais, participando de várias funções biológicas (MANSO, 2006). Para a utilização da glutamina, esta é catabolizada em glutamato, via glutaminase.

O glutamato também participa da síntese de aminoácidos e geração de energia (YI; ALLEE, 2004), especialmente o que vem da dieta, sendo importante substrato para as células da mucosa intestinal (REEDS; BURRIN, 2001).

Desta feita, a glutamina participando de inúmeras funções no organismo, tem como ação de destaque, células de intensa multiplicação, como enterócitos e células do sistema imune, que consomem a glutamina rapidamente, tornando-se importante para leitões nas fases de aleitamento e ao desmame (CURI, 2000; MANSO, 2006).

Fluidos fisiológicos, como o plasma, músculo esquelético, leite de porcas e fluído alantoide ovino, são abundantes em glutamina livre (WU et al., 2006). A grande quantidade de glutamina presente no leite das porcas despertou o interesse dos pesquisadores sobre a presença dos aminoácidos nos fluidos fetais (líquidos amniótico e alantoide), e ainda a atividade da glutamina na placenta (WU; BAZER; WENBIN, 1995; WU et al., 1998; SELF et al., 2004; KIM, et al., 2013).

Procurando associar os dados de isolamento da glutamina na esfera qualitativa com parâmetros produtivos junto à interatividade entre as fases, o estudo objetivou avaliar o

desempenho produtivo e reprodutivo de primíparas e seus leitões até o desmame, suplementando-as (1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta) no terço final da gestação, lactação, intervalo desmame-estro e gestação subsequente, avaliando os fetos aos 73 dias.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão descritas informações sobre os animais utilizados, instalações e a metodologia empregada para obtenção dos resultados neste estudo.

4.2.1 Local e instalações

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (protocolo 2618/2012).

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Suínos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (LPS – VNP/FMVZ) da Universidade de São Paulo, nas unidades de gestação e maternidade. A gestação dispunha de gaiolas individualizadas com oferecimento de dietas através do sistema automático graduado e a maternidade de gaiolas de parição, sendo os bebedouros do tipo chupeta e providas de aquecimento específico (escamoteadores) para os leitões.

4.2.2 Animais e preparação

Foram adquiridas 30 marrãs com peso e idade médios de $71,27 \pm 4,14$ quilos e $131,83 \pm 5,00$ dias. Aos 160 dias de idade foi iniciado o estímulo para a manifestação do estro, através do passeio do macho duas vezes ao dia com duração de 15 minutos/cada.

As fêmeas ao apresentarem peso corporal de $144,36 \pm 5,19$ quilos foram submetidas à inseminação artificial com intervalos de 12 horas e doses de sêmen com 3 bilhões de espermatozoides.

O diagnóstico de prenhez foi realizado com exame ultrassonográfico aos $30,96 \pm 2,07$ dias de gestação. Vinte e quatro fêmeas constituíram o grupo experimental, com aplicação dos tratamentos a partir dos 75 dias de gestação. O parto foi induzido com 1mL de prostaglandina (Sincrocio[®], Ouro Fino), via intramuscular.

4.2.3 Manejo alimentar

As fêmeas receberam 2,8 kg de ração a partir dos 75 dias de gestação (Tabela 7), em dois tratos diários (7:30 e 15:00 horas).

A partir dos cinco dias que antecederam a data provável do parto, reduziu-se gradualmente o oferecimento de ração, acrescido de 0,5 kg de farelo de trigo. No dia do parto a ração não foi oferecida, apenas água à vontade. A partir do dia do parto, iniciou-se o oferecimento de ração de lactação (Tabela 7), com aumento gradual (1º, 2º, 3º e 4º dias receberam 1,5, 2,5, 3,5 e 4,5 kg/dia, respectivamente). Do 5º dia de lactação até o desmame, foi fornecida ração *ad libitum*.

Aos $20,95 \pm 1,89$ dias de lactação os leitões foram desmamados, sendo as fêmeas estimuladas para manifestação do estro com a presença do macho, quando passaram a receber ração de gestação (2,4 kg/dia). Após a inseminação artificial receberam 2,0 kg da mesma ração de gestação (tabela 7) até 73 dias da próxima gestação.

As formulações das rações seguiram as recomendações da empresa Agrocere[®] Multimix.

Tabela 7 - Ingredientes, níveis nutricionais e níveis de garantia das rações experimentais de gestação (Controle e Suplementação) e lactação (Controle e Suplementação)

Ingredientes	Ração de Gestação		Ração de Lactação	
	Controle	Suplementação	Controle	Suplementação
Milho Moído	190,00	187,5	150,00	147,50
Farelo Soja (46% PB)	50,00	50,00	71,00	71,00
Núcleo Gestação ¹	10,00	10,00	-	-
Óleo de soja			9,00	9,00
Açúcar	-	-	10,00	10,00
Núcleo Lactação ²			10,00	10,00
Suplementação ³	-	2,5	-	2,5
Batida	250 Kg	250 Kg	250 Kg	250 Kg
Níveis Nutricionais				
Matéria Seca (%)	89,43	89,99	90,89	91,71
Matéria Mineral (%)	5,56	5,12	5,30	5,39
Energia bruta	3764,5	3873,5	4114	4078,5
Extrato etéreo (%)	3,80	3,27	6,63	7,30
Proteína Bruta (%)	15,44	16,05	16,65	18,41
Cálcio (%)	0,80	0,72	0,73	0,78
Fósforo (%)	0,52	0,47	0,49	0,49

¹ **Núcleo Gestação** (por kg de produto): ác. Fólico 36 mg; ác. Pantotênico 25 mg; biotina 25 mg; cálcio 170 g; cobalto 4 mg; cobre 2500 mg; colina 12 g; ferro 625 mg; fitase 12.500 ftu; fósforo 50 g; flúor 500 mg; iodo 35 mg; manganês 1000 mg; metionina 26,5 g; niacina 487,5 mg; selênio 11,16 mg; sódio 50 g; vit. A 375.000 UI; vit. B1 50 mg; vit. B12 620 mcg; vit. B2 96 mg; vit. B6 50 mg; vit. D3 93.750 UI; vit. E 825 UI; vit. K3 82,5 mg; zinco 1,875 mg. ² **Núcleo Lactação** (por kg de produto): ác. fólico 36 mg; ác. pantotênico 325 mg; biotina 12,5 mg; cálcio 175 g; cobalto 4 mg; cobre 2500 mg; colina 12 g; ferro 625 mg; fósforo 45 g; iodo 35 mg; lisina 36 g; manganês 1000 mg; metionina 25 g; sódio 45 g; niacina 487,5 mg, selênio 11,16; treonina 29,5 g; vit. A 375.000UI; vit. B1 50 mg; vit. B12 620 mcg; vit B2 96 mg; vit B6 50 mg; vit. D3 93.750UI; vit. E 825UI; vit. K 82,5 mg; zinco 1875 mg. ³ **Suplementação**: 10% L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico. Fonte: Agorceres®, 2014.

4.2.4 Tratamentos e delineamento experimental

Aos 75 dias de gestação as fêmeas foram distribuídas de acordo com o peso em dois grupos, grupo Controle, com média e desvio padrão de $186,58 \pm 9,73$ e Suplementado com $185,67 \pm 9,02$ kg. A suplementação com 1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta, em substituição ao milho, foi oferecida a partir dos 75 dias de prenhez; durante a lactação; no intervalo desmame estro e na gestação subsequente até os 73 dias de prenhez.

4.2.5 Peso e espessura de toucinho

As fêmeas foram pesadas aos 75, 83, 91, 99 e aos 107 dias de gestação, quando ocorreu a transferência para maternidade (sete dias antes da data provável do parto).

Na maternidade, as pesagens ocorreram no dia do parto, aos 7, 14 e no desmame programado para os 21 dias de lactação ($20,95 \pm 1,89$ dias), e aos 73 dias da gestação subsequente. A medida da espessura de toucinho foi realizada na região do ponto P2 (Figura 6), juntamente com as pesagens, através de exame ultrassonográfico.

O consumo de ração foi anotado, tendo a averiguação controlada nos cochos automáticos instalados na gestação. Na maternidade o controle foi feito manualmente por pesagem das rações.

Figura 6 - Mensuração da ET por ultrassonografia



Fonte: Parazzi, 2013.

4.2.6 Níveis de glutamina e glutamato

Neste item será descrita a metodologia utilizada para determinar as concentrações de glutamina e glutamato no plasma sanguíneo, colostro e leite das primíparas.

4.2.6.1 Plasma sanguíneo

As colheitas de sangue foram realizadas aos 75, e aos 83, 91, 99, 107 dias de gestação, no dia do parto, aos 7, 14 dias de lactação e ao desmame.

A contenção dos animais para a colheita de sangue foi conduzida com o auxílio do cachimbo e através de punção da veia jugular com seringa de 20 mL e agulha 40 x12 gauges.

Para avaliações dos níveis de glutamina, 5 mL de sangue coletado, foram transferidos imediatamente para tubos com anticoagulante, para obtenção do plasma sanguíneo. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. O plasma foi obtido e armazenado em microtubos eppendorfs® de 2 mL, os quais foram congelados a -80°C para posterior preparação das amostras e análises dos níveis de glutamina e glutamato.

A preparação das amostras para avaliação da glutamina e glutamato foi descrita por Manso (2006). Para tanto, foram pesados os tubos criogênicos vazios de 4 mL, os pesos anotados (TV) e identificados de acordo com os animais. Em eppendorfs de 2 mL, foi colocado 1 mL de ácido perclórico (PCA) a 10% e 1 mL do plasma anteriormente congelado e homogeneizado. As amostras permaneceram em repouso por 5 minutos sob refrigeração. Após esse período foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido (figura 7) para os tubos de 4 mL previamente pesados (Figura 7). O tubo com o sobrenadante foi pesado (Figura 8) novamente e o peso anotado (Balança SHIMADZU, mod AY220). Foram adicionadas às amostras 2 gotas de indicador de pH (pH-Indicator Solution, Universal Incicator, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), deixando-as de cor rosa (ácida). Em seguida, as amostras foram neutralizadas (Figura 9) com hidróxido de potássio (KOK 1M). Ao término, com o conteúdo dos tubos de cor verde clara, indicando pH 7, os tubos foram novamente pesados e os pesos anotados. Após esses procedimentos as amostras foram congeladas a -20°C para posterior análise no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal (BIOPA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob a responsabilidade da professora Dra. Helena Emília C.C.C. Manso.

Foram pipetados 0,20 mL da amostra desproteïnizada e neutralizada, que estava congelada e misturada a 0,25 mL de água, 0,50 mL de acetato de sódio (0,5 M, pH 5) e 0,05 mL de glutaminase (SIGMA – ALDRICH G8880–10 unidades). A solução foi homogeneizada e colocada para incubação no banho maria a 37° C por 1 hora, para que a conversão da glutamina em glutamato ocorresse nas condições ideais.

Após a incubação, 0,5 mL dessa amostra foi misturada a 1,5mL de solução tampão (TRIS 0,2 M, 1,5 mL de água, 0,3 mL de hidrazina e 0,09 mM de NAD^+). Essas amostras preparadas em cubetas foram lidas em espectrofotômetro (Figura 10), a 340 nm (Spectrum Meter SP-2000UV). Após a leitura, foi acrescentada (0,2mL) a desidrogenase glutâmica (SIGMA - ALDRICH G2626-50MG) e uma nova leitura no espectrofotômetro foi realizada após 30 minutos.

A diferença entre as leituras foram as quantidades de glutamina e glutamato e o total de glutamato. A concentração de glutamina foi obtida através da subtração entre o total de glutamato e o total de glutamina e glutamato.

Figura 7 - Transferência do sobrenadante



Fonte: Parazzi, 2014.

Figura 8 - Pesagem das amostras



Fonte: Parazzi, 2014.

Figura 9 - Neutralização das amostras



Fonte: Parazzi, 2014.

Figura 10 - Espectrofotômetro



Fonte: Parazzi, 2014.

4.2.6.2 Colostro e leite

Durante o aleitamento, foram colhidas amostras de colostro e leite em tubos estéreis no dia do parto e aos 7, 14 e 20,95 ± 1,89 dias de lactação. Para obtenção das amostras de leite, foi administrado 1 mL de ocitocina (Placentex, Agener União, Saúde Animal) na veia auricular da orelha.

4.2.6.3 Níveis de glutamina e glutamato

As amostras foram congeladas a -80°C para desproteínização e neutralização, seguindo das análises das concentrações de glutamina e glutamato no mesmo laboratório de referência (BIOPA), seguindo o mesmo protocolo descrito para o plasma.

4.2.7 Percentual de gordura

Para determinação da gordura no colostro, e leite aos 7, 14 dias de lactação e ao desmame, foi empregado o método de Gerber, no Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite do VNP-FMVZ/USP. O método consiste em quebrar a gordura através da ação do ácido sulfúrico e separá-la pela centrifugação.

Para a determinação da gordura, 10 mL de ácido sulfúrico foram transferidos para o butirômetros e adicionados 11 mL da amostra de colostro ou leite com 1 mL de álcool amílico, sendo misturados até completa dissolução. Os butirômetros foram centrifugados a 1000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Simplex II, JH 466, ITR Instrumentos para Laboratório). Após a centrifugação a leitura foi realizada na parte inferior do menisco, onde o número do mL ocupado pela camada oleosa indica o percentual de gordura da amostra analisada.

4.2.8 Leitões no aleitamento

Após o parto foi registrado o tamanho da leitegada, anotando-se o total de leitões nascidos, nascidos vivos, natimortos e mumificados. Após completa expulsão da placenta, esta foi pesada. Foi feita a equalização das leitegadas para homogeneização dos leitões nos tratamentos, formando-se blocos com 10 e 11, e outro com 12 e 13 leitões. Os leitões foram pesados individualmente ao nascimento, aos 7, 14 e $20,95 \pm 1,89$ dias de idade e o ganho de peso foi considerado nestes intervalos.

4.2.9 Intervalo desmame estro

Ao desmame, as fêmeas foram transferidas para a unidade de gestação, sendo estimuladas a manifestar o estro pós desmama por meio do passeio dos machos, duas vezes ao dia, considerando-se o reflexo de tolerância positivo ao homem e ao macho. Assim, foi registrado o tempo para manifestação do estro, quando foram novamente inseminadas artificialmente.

4.2.10 Avaliação dos ovários e fetos da gestação subsequente

Foram analisados aos $73,45 \pm 1,61$ da segunda gestação os ovários (taxa de ovulação) e os fetos (comprimento e peso individuais).

O abate das fêmeas seguiu às normas de bioética e o método utilizado foi a eletronarcorese seguida da sangria. A retirada do aparelho reprodutivo (útero e ovários) ocorreu por meio da incisão na linha branca na região inguinal, seguida de sutura da musculatura, tecidos adjacentes e pele, permitindo que a carcaça continuasse na linha de abate. As amostras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos identificados e transportadas dentro de isopor ao LPS.

A técnica para colheita dos líquidos seguiu recomendações de Zogno (2002). Para tanto, após incisão do útero e exposição do conjunto de anexos embrionários e fetos. Após caracterização macroscópica das membranas fetais, foram colhidos 2 mL com auxílio de seringa e agulha dos líquidos das cavidades alantoideana e amniótica, em frascos criogênicos e congelados a -80°C. Após a colheita das amostras, os fetos foram retirados para medidas de peso e comprimento.

Os fetos foram avaliados quanto à idade, estimada pela data de inseminação das fêmeas, associado a medida do comprimento “crown rump” com auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, modelo CD8”CX-B, 200 milímetros) colocado entre as articulações atlanto-occipital e a sacro-coccígea, cujo registro foi comparado à tabela cronológica de desenvolvimento de suínos, segundo Hyttel (2010). Adicionalmente foi mensurado o peso dos fetos em balança analítica (Shimadzu, modelo BL 3200H) como método complementar.

Para a determinação das concentrações de glutamina e glutamato nos líquidos amniótico e alantoide, a mesma metodologia empregada para o plasma, colostro e leite foram utilizadas (Item 4.2.6).

4.2.11 Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados em função do peso das fêmeas aos 75 dias de gestação. A unidade experimental considerada foi a fêmea.

As premissas da análise estatística foram verificadas quanto à normalidade dos resíduos pelo teste do Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e homogeneidade das variâncias. As variáveis que não respeitaram as premissas foram transformadas a fim de tornar os dados mais homogêneos ou foi realizada estatística não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis). As variáveis de desempenho das fêmeas e leitões, análise reprodutiva aos 73 dias de gestação e percentual de gordura, foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED), e os valores das concentrações de glutamina e glutamato acrescido de medidas repetidas no tempo. As concentrações para os líquidos fetais foram avaliados com o peso dos fetos como covariáveis.

Os dados foram analisados pelo programa SAS 9.2 (2002-2008). O nível de significância considerado foi de 5%. Posteriormente, foram analisadas as variabilidades de algumas características, pelo teste “F”.

4.3 RESULTADOS

Os pesos das fêmeas ao início do tratamento, terço final da gestação, parto, lactação e ao desmame não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios e desvios padrão do peso em quilos, das fêmeas ao início do tratamento, aos 75, 83, 91, 99 e 107 dias de gestação e após o parto

Peso (kg)	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=12)	Suplementadas (n=12)	
75 d gestação	186,58 ± 9,73	185,67 ± 9,02	0,3647
83 d gestação	193,00 ± 9,15	193,67 ± 7,37	0,7085
91 d gestação	199,58 ± 9,10	199,92 ± 6,49	0,5891
99 d gestação	204,58 ± 9,83	205,96 ± 5,99	0,8803
107 d gestação	211,54 ± 9,61	214,42 ± 7,14	0,7313
Pós parto	189,75 ± 5,58	188,90 ± 7,69	0,0914
Lactação 7*	190,30 ± 7,25	190,26 ± 10,52	0,9443
Lactação 14*	190,31 ± 5,85	192,06 ± 16,01	0,6593
Desmame*	186,40 ± 10,31	190,33 ± 14,87	0,5319

*controle n=10, suplementadas n=9

Fonte: Parazzi, 2014.

A espessura de toucinho das fêmeas terço final da gestação, parto, lactação e ao desmame não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios e desvios padrão da espessura de toucinho (ET) em milímetros das fêmeas ao início do tratamento, durante o final da gestação e após o parto

ET (mm)	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=12)	Suplementação (n=12)	
75 d gestação	13,85 ± 2,39	14,67 ± 3,02	0,4709
83 d gestação	13,75 ± 2,82	15,37 ± 2,48	0,1507
91 d gestação	13,68 ± 2,92	15,30 ± 2,32	0,1462
99 d gestação	13,73 ± 2,89	14,15 ± 2,37	0,7031
107 d gestação	13,37 ± 2,70	15,30 ± 2,75	0,0970
Pós parto	13,76 ± 2,97	14,84 ± 3,61	0,3755
Lactação 7*	13,24 ± 3,20	14,71 ± 3,23	0,3499
Lactação 14*	12,76 ± 1,43	13,66 ± 3,68	0,5312
Desmame*	12,48 ± 2,21	13,66 ± 2,97	0,3499

*controle n=10, suplementadas n=9

Fonte: Parazzi, 2014.

Os valores de glutamina e glutamato encontrados no plasma das fêmeas no final da gestação e no parto foram representados na tabela 10.

As concentrações de glutamina e glutamato no plasma das fêmeas foram significativas para o tratamento ($p=0,0028$). Ao início do experimento, coincidentemente o grupo suplementado apresentou maiores níveis, pois, a suplementação iniciou após a colheita de sangue. Ao longo da gestação os níveis de glutamina e glutamato permaneceram equilibrados entre os tratamentos, mas após o parto o grupo suplementado manteve uma concentração mais alta.

Tabela 10 - Concentração de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no plasma das fêmeas no final da gestação e após o parto

Período	Tratamentos		Médias
	Controle (n=12)	Suplementadas (n=12)	
75 d gestação	0,4872 ± 0,10	0,6167 ± 0,17	0,5547 ^{ab} ± 0,16
83 d gestação	0,5679 ± 0,07	0,5869 ± 0,12	0,5774 ^a ± 0,10
91 d gestação	0,4558 ± 0,08	0,4711 ± 0,05	0,4630 ^b ± 0,07
99 d gestação	0,5568 ± 0,05	0,5768 ± 0,06	0,5668 ^a ± 0,05
107 d gestação	0,5114 ± 0,12	0,5345 ± 0,14	0,5229 ^{ab} ± 0,13
Pós parto	0,3811 ± 0,15	0,5283 ± 0,15	0,4578 ^b ± 0,17
Médias	0,4940 ± 0,11	0,5531 ± 0,13	

Probabilidades: trat=0,0028; per=<.0001; interação, trat*tempo=0,2518

Fonte: Parazzi, 2014.

Os valores das concentrações de glutamina e glutamato durante a lactação no plasma das fêmeas foram representados na tabela 11.

Durante a lactação as fêmeas do grupo suplementado apresentaram níveis mais altos de glutamina e glutamato no plasma em relação ao grupo controle, embora não tenha sido detectada diferença significativa.

Tabela 11 - Concentração de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no plasma das fêmeas durante a lactação e ao desmame

Lactação	Tratamentos	
	Controle (n=10)	Tratamento (n=9)
7	0,6672 \pm 0,23	0,7312 \pm 0,22
14	0,5925 \pm 0,14	0,6843 \pm 0,14
desmame	0,5862 \pm 0,11	0,7069 \pm 0,16

Probabilidades: trat=0,1797; per=0,4960; interação trat*tempo=0,5800

Fonte: Parazzi, 2014.

O consumo médio diário de ração durante a lactação não diferiu entre os grupos controle e suplementado, $4,54 \pm 0,50$ kg e $4,57 \pm 0,81$, respectivamente ($p > 0,05$). É oportuno salientar que estes valores encontram-se abaixo do que é recomendado para as linhagens hiperprolíficas atuais, cabendo o comentário de que influências como a época do ano, no caso época quente, pode ter afetado o consumo, sem danos com relação aos ganhos e perdas das fêmeas no ciclo lactação e gestação subsequente.

Quanto ao número total de leitões nascidos, nascidos vivos, mumificados, natimortos e peso da placenta, observou-se diferença significativa entre os tratamentos no número de nascidos vivos com superioridade para o grupo controle, não havendo diferença significativa nas demais características (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores médios e desvios padrão do número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos, mumificados, peso da placenta (kg), mortalidade no aleitamento (percentual de leitões mortos), leitões leves (nasceram com peso inferior a 1,100 gramas) e os pesos (nascimento, 7, 14 e desmame) e ganhos de pesos (nascimento a 7, 7 a 14 e 14 ao desmame) dos leitões durante o aleitamento

	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=12)	Suplementação (n=12)	
Nascidos totais	15,10 ± 1,64	13,40 ± 3,92	0,2039
Nascidos vivos	13,72 ± 1,90	11,42 ± 2,84	0,0346
Natimortos	1,60 ± 0,55	1,75 ± 0,96	0,8739
Mumificados	1,67 ± 0,58	2,40 ± 0,55	0,1446
Placenta (kg)	3,63 ± 0,90	3,64 ± 0,97	0,9673
Mortalidade aleitamento (%)	14,04	3,17	0,0003
Leitões leves (%)	15,84	18,33	0,7542
Pesos médios dos Leitões			
Nascimento	1,33 ± 0,13	1,41 ± 0,21	0,3942
7 dias	2,48 ± 0,24	2,43 ± 0,17	0,5887
14 dias	3,99 ± 0,42	3,87 ± 0,41	0,5443
Desmame	5,39 ± 0,79	5,09 ± 0,82	0,4633
Ganhos de pesos médios dos leitões			
Nascimento a 7 dias	1,134 ± 0,19	0,990 ± 0,19	0,1230
7 aos 14	1,500 ± 0,23	1,435 ± 0,28	0,5981
14 ao desmame	1,614 ± 0,65	1,220 ± 0,55	0,1686

Fonte: Parazzi, 2014.

Ao nascimento, 7 e 14 dias, e no desmame ($20,95 \pm 1,89$) os leitões foram pesados, não sendo observada diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 12). No ganho de peso dos leitões, dos 7 aos 14 e dos 14 ao desmame, também não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 12).

O índice de sobrevivência dos leitões, em cada tratamento, foi representado na tabela 12, retratando a taxa de mortalidade na maternidade e o percentual de leitões nascidos com peso inferior a 1,100 gramas. As fêmeas do grupo controle apresentaram maior mortalidade ($p=0,0003$) de leitões em relação ao grupo suplementado.

O percentual de gordura e as concentrações de glutamina e glutamato no colostro (Tabela 13), não foram significativos, verificando-se somente maior valor numérico no percentual de gordura no colostro maior para o grupo suplementado ($p=0,0827$).

Tabela 13 - Percentual de gordura, concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no colostro, conforme os tratamentos

Colostro	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=12)	Suplementadas (n=12)	
Gordura (%)	5,11 \pm 0,83	6,33 \pm 1,81	0,0827
Gln + Glu	0,2094 \pm 0,09	0,2592 \pm 0,08	0,2018

Fonte: Parazzi, 2014.

Durante a lactação, aos 7, 14 dias e ao desmame, o percentual de gordura do leite manteve-se equilibrado entre os tratamentos, sem diferenças significativas, como mostra a tabela 14.

Tabela 14 - Percentual de gordura no leite das primíparas e desvios padrão, aos 7, 14 dias e ao desmame, de acordo com os tratamentos

Gordura	Tratamentos	
	Controle (n=10)	Suplementadas (n=9)
Leite 7	7,52 \pm 1,52	7,59 \pm 1,80
Leite 14	7,99 \pm 1,10	7,17 \pm 1,24
Leite 21	7,42 \pm 1,70	7,12 \pm 1,42

Probabilidades: tratamento $p=0,3977$, período= $0,7815$, interação tempo e tratamento $p=0,6856$.

Fonte: Parazzi, 2014.

As concentrações de glutamina e glutamato no leite durante a lactação, aos 7 e 14 dias e no desmame, não foram significativas (Tabela 15). Numericamente, o grupo suplementado apresentou níveis maiores em relação ao grupo controle.

Tabela 15 - Concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) no leite e desvios padrão durante a lactação, aos 7 e 14 dias e no desmame, conforme os tratamentos

Lactação	Tratamentos	
	Controle (n=10)	Suplementadas (n=9)
7	0,6743 \pm 0,15	0,7178 \pm 0,21
14	0,7036 \pm 0,18	0,8785 \pm 0,28
Desmame	0,6514 \pm 0,20	0,7173 \pm 0,29

Probabilidades: trat=0,2585; per=0,6548; interação trat*tempo=0,6454

Fonte: Parazzi, 2014.

Após o desmame, aos $20,95 \pm 1,89$ dias de lactação, as fêmeas foram transferidas para a unidade de gestação, quando foram novamente estimuladas para manifestação do estro.

Os dados relativos ao intervalo desmame estro e duração do estro não foram significativos (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores médios e desvios padrão do intervalo desmame estro (IDE) em dias e horas de duração do estro

	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=9)	Suplementadas (n=7)	
IDE (dias)	4,50 \pm 1,08	4,29 \pm 0,76	0,6821
horas em estro	57,60 \pm 9,47	54,86 \pm 13,61	0,6301

Fonte: Parazzi, 2014.

Aos $73,45 \pm 1,61$ dias de gestação as fêmeas foram abatidas no Abatedouro Escola da PCAPS-USP, campus de Pirassununga.

Os pesos e as espessuras de toucinhos aos $73,45 \pm 1,61$ dias da segunda gestação foram representados na tabela 17.

Tabela 17 - Valores médios e desvios padrão do peso (kg) e da espessura de toucinho (ET) em milímetros das fêmeas aos $73,45 \pm 1,61$ dias da segunda gestação

	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=9)	Suplementadas (n=7)	
Peso (kg)	217,83 \pm 9,82	223,63 \pm 11,98	0,2435
ET (mm)	15,92 \pm 3,84	16,26 \pm 2,87	0,8276

Fonte: Parazzi, 2014.

As características analisadas ao abate das fêmeas não diferiram estatisticamente (Tabela 18). O peso dos fetos do grupo suplementado foi numericamente maior e próximo da significância ($p=0,0698$). Na análise das estimativas das variâncias, houve diferença significativa ($p<0,05$) no número de fetos do útero direito e que refletiu no número de fetos totais, indicando maior homogeneidade para o grupo suplementado.

Tabela 18 - Valores médios e desvios padrão do peso do útero em quilos, número de corpos lúteos nos ovários direito (CL dir) e esquerdo (CL esq), totais (CL totais), taxa de ovulação (Tx ov), número de fetos encontrados nos cornos uterinos direito (N fetos dir) e esquerdo (N fetos esq), totais (N fetos totais), peso placenta (PLA) em quilos, peso médio dos fetos (Peso fetos) em quilos e a medida média (Medida fetos) dos fetos em centímetros

	Tratamentos		Probabilidade (P)	
	Controle (n=9)	Suplementadas (n=7)	P	P das variâncias
Peso útero	19,31 \pm 6,75	20,33 \pm 4,39	0,7364	0,3121
CL direito	10,44 \pm 3,50	11,00 \pm 2,94	0,7418	0,6903
CL esquerdo	11,66 \pm 1,66	11,14 \pm 1,21	0,4962	0,4641
CL totais	22,11 \pm 3,98	22,14 \pm 2,61	0,9858	0,3188
N fetos dir	8,11 \pm 2,37	7,42 \pm 0,79	0,4802	0,0150
N fetos esq	7,33 \pm 1,94	6,85 \pm 1,06	0,5703	0,1650
N fetos totais	15,44 \pm 3,50	14,28 \pm 1,25	0,3250	0,0219
Taxa de ovulação	7,28 \pm 2,10	7,47 \pm 1,48	0,8357	0,3863
Peso placenta	7,44 \pm 1,92	7,69 \pm 1,42	0,7546	0,4083
Peso fetos	332,19 \pm 43,52	366,15 \pm 35,76	0,0698	0,6505
Medida fetos	15,03 \pm 0,59	15,36 \pm 0,59	0,3715	0,5370

Fonte: Parazzi, 2014.

As concentrações de glutamina e glutamato nos líquidos alantoide e amniótico não mostraram diferenças significativas (Tabela 19), e os valores são próximos, dada as colheitas realizadas de fetos com pesos semelhantes, cujos pesos não influenciaram os resultados ($p>0,05$).

Tabela 19 - Concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) nos líquidos fetais (alantoide e amniótico) e desvios padrão de acordo com os tratamentos

	Tratamentos		Probabilidade
	Controle (n=9)	Suplementadas (n=7)	
Amniótico	0,8438 \pm 0,16	0,8764 \pm 0,24	0,7177
Alantoide	0,8499 \pm 0,24	0,9085 \pm 0,34	0,8012

Fonte: Parazzi, 2014.

4.4 DISCUSSÃO

A glutamina é considerada um aminoácido não essencial, contudo os estudos têm constatado os efeitos no metabolismo celular, aliados a biologia dos suínos com repercussões nos aspectos produtivos dos sistemas de produção (WU et al., 2011). Destaca-se que particularmente, em condições de estresse e catabolismo intenso, no caso da fêmea em lactação, frente a utilização de suas reservas corporais para a produção de leite, a glutamina torna-se necessária e essencial, justificando sua suplementação (MANSO, 2006).

As perdas excessivas de peso nessa fase podem acarretar alteração no intervalo desmame estro, aumentando assim os dias não produtivos. Manso et al. (2012) comentam que a suplementação com glutamina e glutamato pode prevenir as perdas de massa corporal durante a lactação, interferindo positivamente na eficiência reprodutiva. Além disso, a L-glutamina tem importância na esfera reprodutiva, como precursora na síntese de nucleotídeos, essenciais na proliferação celular, como células embrionárias e trofoblastos (WU, 1998).

O presente estudo vem mostrar um aspecto interativo que engloba as fases de gestação, lactação, período de gestação inicial e médio subsequente e a produção de leitões e fetos de maneira a inferir a ação da glutamina e do glutamato.

Assim sendo, os resultados médios nos parâmetros, peso das fêmeas no terço final da gestação, no parto, lactação e desmame não identificaram diferenças significativas. Apesar dos valores de peso não representarem diferenças significativas, na evolução dos pesos, nos períodos de 83 aos 107 dias de gestação, a variabilidade do grupo suplementado foi menor comparado ao controle. Por sua vez, na lactação o grupo suplementado apresentou ganho de 1,43 kg, enquanto que o controle perdeu 3,3 kg.

Acrescentando a essa avaliação os valores para a espessura de toucinho das fêmeas no terço final da gestação até o parto, mostraram-se valores numericamente maiores no grupo suplementado que na verdade reforçam o caráter sugestivo de interferências para o ganho observado na lactação. Apesar dos valores de ET não terem sido significativos durante a lactação, o grupo suplementado obteve menores percentuais de perdas. Há, de certa forma, semelhança de respostas nos estudos de, Aquino et al (2013) com porcas lactentes suplementadas com 1,5% de Aminogut[®] havendo perda de 1,98% durante a lactação nas suplementadas comparado com 11,07% de peso do controle.

O peso e a espessura de toucinho refletem a melhor condição corporal das fêmeas, que é importante no desmame, para que possam apresentar um IDE dentro da normalidade e seguir novo ciclo reprodutivo. Embora o grupo suplementado tenha apresentado um valor numericamente melhor em relação ao peso e a ET, os dois grupos mantiveram condições ideais, o que não influenciou o tempo para a manifestação do estro pós desmame e a gestação seguinte. Contudo, mesmo havendo maior variabilidade da condição corporal de fêmeas em condições diferenciais próprias dos sistemas de produção com maior número de fêmeas, pode haver nesse caso, o destacar de diferenças maiores de ganhos e perdas que podem refletir efeitos mais evidentes da suplementação. Assim, Manso et al., (2012) verificaram resultados mais acentuados, sobre as diferenças de ganhos e perdas de peso, no terço final da gestação e lactação, mesmo assim não havendo diferenças significativas entre os grupos controle, glutamina e Aminogut[®].

A glutamina suplementada na fase de lactação pode influenciar na composição do leite, pois, tem participação no metabolismo de proteínas, lipídios e açúcares (AQUINO et al., 2013). A composição nutricional do leite oferecido aos leitões pode influenciar seu desempenho, melhorando as condições de sobrevivência na maternidade e ao desmame. Nesse quesito, a suplementação melhorou a sobrevivência dos leitões na maternidade, pois, o grupo suplementado teve percentual de 3,67% e grupo controle 15,38%.

Ao contrário, Manso et al., (2012), obtiveram menor número de leitões desmamados no grupo de fêmeas suplementadas com L-glutamina e L-ácido glutâmico (2,5%), e menores nos grupos glutamina (2,5%) e controle.

Praticamente 25% dos leitões neonatos nascem com peso inferior a 1,100kg (WU et al., 2010a), e merecem cuidados especiais nas granjas para sobreviverem e alcançarem o peso dos outros leitões nascidos mais pesados. Esse baixo peso ao nascimento dificulta a sobrevivência dos leitões e as concentrações de glutamina no plasma destes, são menores comparado aos leitões com peso maior. (WU et al., 2010a). Por isso, a suplementação da mãe durante a lactação é interessante, aumentando os níveis de glutamina no leite que é oferecido aos leitões. A taxa de sobrevivência no grupo suplementado pode ser explicada pelo maior aporte de glutamina e glutamato oferecidos no leite, que foi maior para o grupo suplementado, embora não seja significativo.

Destacando o percentual de leitões nascidos com peso inferior a 1,100 gramas, os dois tratamentos não foram diferentes ($p=0,7542$), inclusive com maior percentual para o grupo suplementado em relação ao controle (18,33 versus 15,84, respectivamente), mas, aliado ao percentual de sobrevivência discutido, a suplementação das fêmeas foi eficaz também na nutrição dos leitões com peso inferior dado a baixa mortalidade na maternidade. Portanto, a suplementação na dieta das fêmeas pode ajudar na sobrevivência dos leitões durante a lactação, principalmente os leitões mais leves.

Não foi possível encontrar justificativa para a diferença significativa observada no número de nascidos vivos, a favor do grupo controle, pelo fato de que a suplementação ocorreu no terço final da gestação, a partir de 75 dias, fase em que o número de embriões e posteriormente fetos, e as possíveis perdas no início da gestação, que é um período crítico, já haviam sido estabelecidas. Destaca-se a individualidade das fêmeas e a homogeneidade destas, distribuídas nos tratamentos, portanto, a suplementação não pode ter influenciado o número de leitões nascidos.

É interessante acrescentar que fêmeas suplementadas a partir de 40 dias de gestação até 85º ou até o parto, testadas em 5 tratamentos (controle, 1% arginina, 1% glutamina, 1% Aminogut[®], 0,5% arginina e 0,5% Aminogut[®]), o número de mumificados foi maior nas fêmeas tratadas com 0,5% de Aminogut[®] e 0,5% de arginina, e a autora discutiu que o fato possa ter sido pelo excesso ou combinação dos aminoácidos (OSAVA, 2011). No presente experimento, apesar da significância não encontrada para o número de mumificados, a porcentagem pode ser considerada de média para alta cabendo uma justificativa que está

particularmente associado a influência de altas temperaturas verificadas na época da experimentação.

Osava (2011), ainda pontua que não foram encontradas diferenças significativas para o peso ao desmame dos leitões, intervalo desmame estro, peso das fêmeas ao parto e peso da placenta, semelhante aos resultados encontrados neste estudo. Ainda, a autora não encontrou diferenças quanto ao número de leitões nascidos, totais e vivos, diferentemente deste estudo em o número de nascidos vivos foi maior para o grupo controle ($p < 0,05$). Nesse estudo, o número de nascidos vivos foi reflexo do número de nascidos totais, que não mostrou significância embora o valor numérico tenha sido superior. A divisão das fêmeas nos grupos experimentais foi de acordo com o peso vivo no início do experimento aos 75 dias de gestação e, portanto, já ultrapassada as fases de fertilização, desenvolvimento embrionário, início de desenvolvimento fetal e ainda as fases de maiores perdas.

Outro estudo (AQUINO⁷, 2012, apud AQUINO et al., 2013), verificou aumento de 8,87% no peso dos leitões desmamados aos 21 dias de lactação de porcas que foram suplementadas, resultados discordantes dos obtidos nesse estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Manso et al. (2012), que não encontraram diferenças suplementando primíparas 30 dias antes do parto e durante a lactação com 2,5% de Aminogut[®] e 2,5% de glutamina, em relação ao tamanho da leitegada, peso ao nascimento e peso dos leitões ao desmame.

Kitt, Miller e Fischer (2004) suplementaram fêmeas durante a lactação com 2,5% de glutamina em substituição ao milho, e verificaram aumento na glutamina plasmática no dia 7 e 21 de lactação, e ainda 46% e 265% a mais no leite nos mesmos dias em relação às fêmeas que não foram suplementadas.

O mesmo estudo já citado, (AQUINO⁷ 2012, apud AQUINO et al., 2013) verificou no colostro e leite aos 7 e 21 dias de lactação, um aumento de 2,74%, 0,34% e de 2,10% de gordura, respectivamente e que o conteúdo foi mantido em todo o período de lactação, diferentemente das porcas do grupo controle que apresentaram queda entre 7 e 21 dias de 26,9%. Os resultados não corroboram com o deste estudo, no qual não foram detectadas diferenças no percentual de gordura no colostro e leite, embora tenha havido tendência a favor do grupo suplementado.

⁷ AQUINO, R.S. Efeito da glutamina em matrizes suínas lactantes. 2012. 76f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE

O mesmo autor mencionado acima encontrou nas porcas suplementadas com 1,5% de Aminogut[®], aumento de 62,40% de glutamina e 50,95% de glutamina e glutamato aos 21 dias de lactação.

Já Manso et al. (2012) encontraram maiores níveis de glutamina e glutamato no leite (240%) aos 21 dias suplementando fêmeas com 2,5% de Aminogut[®].

Aos $73,45 \pm 1,61$ da segunda gestação, em que o grupo suplementado superou o controle em 5,69 quilos, que aliada à avaliação conjunta interativa, a suspeita de alguma influência da suplementação, merecendo com isso futuros estudos.

Nessa avaliação, embora o valor relativo ao peso dos fetos não tenha sido significativo, houve um resultado próximo à significância ($p=0,0698$), que merece ser destacado e relaciona-se a menor variabilidade quanto ao número de fetos, e ao maior peso médio numérico dos fetos do grupo suplementado, que mostrou diferencial de 33,96 gramas.

Quando se associam as duas características, número médio de fetos dos dois grupos, multiplicado pelo peso médio dos fetos correspondente a cada grupo, numericamente há um valor total a mais no grupo suplementado de 368,68 gramas. Esses dados quantitativos aliados à variabilidade suscita a hipótese de que poderia ter havido influência da suplementação sobre o desenvolvimento dos fetos provocando uma maior homogeneidade dos mesmos ou ainda a influência poderia ter sido através do ambiente uterino, dada a suplementação desde o início da gestação. É conveniente salientar que na averiguação constatou-se no grupo suplementado nenhum feto mumificado e no grupo controle 2, reforçando a observação quanto a maior uniformidade de desenvolvimento dos fetos.

A variabilidade no número de fetos no corno uterino direito foi significativa ($p=0,0150$), refletindo no número total de fetos ($p=0,0219$), conferindo maior homogeneidade para o grupo suplementado.

Todas as células e tecidos nos fetos e neonatos utilizam glutamina, além de ser substrato para os fetos (WU, 2010 b,c).

A hiperplasia das fibras musculares ocorre na gestação, já após o nascimento o crescimento das fibras ocorre por hipertrofia, e aos 90 dias está completa (WIGMORE; STICKLAND, 1983). De 35 aos 60 dias de gestação, as fibras primárias crescem gradualmente, já as secundárias se formam rapidamente de 50 até 90 dias de gestação (WIGMORE; STICKLAND, 1983).

As fibras secundárias podem ser influenciadas por vários fatores, inclusive a nutrição materna (WIGMORE; STICKLAND, 1983), ocorrendo durante o período gestacional e após o nascimento são fixas (DWYER; STICKLAND; FLETCHER, 1994).

As fibras musculares do tipo I e II são conhecidas como oxidativas e glicolíticas (CEDDIA; GARCIA JÚNIOR; CURI, 2000), e de modo geral as oxidativas possuem maior densidade de células satélites e podem conter mais glutamina. A síntese de glutamina pode ser influenciada pelo tipo de fibra muscular (ROWBOTTOM; KEAST⁸, 1996, apud CRUZAT, et al. 2009).

Dwyer, Stickland e Fletcher, (1994) realizaram um estudo em que um maior aporte nutricional foi dado às fêmeas durante a gestação em vários períodos, e os resultados sugeriram que o maior aporte oferecido de 25 a 50 dias de gestação, antes da hiperplasia muscular pode ter efeito no desenvolvimento das fibras secundárias. Além disso, os resultados mostraram que os leitões por volta de 80 kg, apresentam melhor crescimento e eficiência alimentar.

Diante dos relatos encontrados na literatura, além da ação da glutamina no músculo esquelético, o fato sugere que o maior peso dos fetos do grupo suplementado seja um efeito da suplementação das primíparas antes da hiperplasia das fibras musculares secundárias.

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no fluido amniótico, tendo importante papel no desenvolvimento fetal de suínos (WU; BAZER; WENBIN, 1995). Estudos tem comprovado a atividade da enzima glutamina sintetase na placenta de suínos (SELF et al., 2004) e equinos (MANSO FILHO et al., 2008).

De acordo com os resultados da pesquisa feita por Wu, Bazer e Wenbin (1995) a glutamina é o aminoácido mais abundante encontrado no fluido amniótico nos 3 primeiros meses de gestação, sendo fonte de aminoácidos para o feto. Aos 60 dias de gestação a concentração de glutamina no líquido amniótico foi de 817 $\mu\text{Mol/L}$, já o glutamato foi aumentando até os 60 dias (295 $\mu\text{Mol/L}$) e após diminuiu (WU; BAZER; WENBIN, 1995).

Já no fluido alantoide, a concentração de glutamato é maior em relação à glutamina, chegando a 1257 $\mu\text{Mol/L}$ aos 45 dias, mas 609 aos 60 dias $\mu\text{Mol/L}$ de gestação (WU; BAZER; WENBIN, 1995).

A concentração de glutamina e glutamato no fluido amniótico de equinos ao parto, foi de 310 e 65 $\mu\text{Mol/L}$, respectivamente (MANSO FILHO et al., 2009). Já na placenta, o mesmo

⁸ ROWBOTTOM D.G.; KEAST D.; MORTON A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med.* 1996;21:80-97

estudo verificou concentrações de 2,836 e 3,550 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ de glutamina e glutamato, respectivamente.

Na placenta de suínos a concentração de glutamina aos 60 dias foi 1,24 nmol/mg e aos 110 dias de gestação foi de 0,95 nmol/mg, ressaltando-se sua abundância (SELF et al., 2004).

Neste estudo as concentrações de glutamina e glutamato nos líquidos amniótico e alantoide, não diferiram estatisticamente, embora, tenha sido ligeiramente maior para o grupo suplementado. Os aminoácidos foram encontrados nos líquidos, como demonstraram as pesquisas, contudo, nesse estudo a diferença foi muito sutil, podendo estar ligada a homogeneidade das fêmeas e conseqüentemente dos fetos, dos quais os líquidos foram colhidos.

A presença e quantidade da glutamina em fluidos fetais e anexos tem despertado o interesse na pesquisa sobre a concentração deste aminoácido. Aliado aos resultados, observamos em relação ao peso e homogeneidade dos fetos aos 73 dias de gestação, o estudo destaca a necessidade de futuras pesquisas mais aprofundadas com a suplementação nessa fase específica.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos parâmetros leva a ponderar sobre a importância da suplementação com L-glutamina e L-ácido glutâmico na manutenção de uma menor variabilidade nas fêmeas quanto à composição corporal e espessura de toucinho aliado aos níveis de glutamina e glutamato analisados. Na sequência de avaliações, incluindo o período de lactação e a análise de desempenho dos leitões uma observação de destaque foi a maior sobrevivência observada dos leitões de mães suplementadas durante o aleitamento. Particularmente, na sequência de averiguações o peso dos fetos aos 73 dias da gestação subsequente, também se caracterizou num resultado de interesse, pois, o período de efeito da suplementação coincidiu com a fase de desenvolvimento fetal, quando ocorre a hiperplasia muscular, o que resultou em fetos um pouco mais pesados e homogêneos que podem refletir em leitegadas mais homogêneas e pesadas, caracterizando no desenvolvimento posterior até o abate. Essa colocação poderia trazer uma vantagem econômica para o sistema de produção.

Estudos mais aprofundados merecem destaque, pois o estudo trouxe novas possibilidades no uso da suplementação com L-glutamina e L-ácido glutâmico, no terço final da gestação e na lactação, mas, principalmente nos terços inicial e médio da gestação, numa sequencialidade de utilização que leva a reflexos positivos relacionados à viabilidade e sobrevivência dos leitões e fetos mais pesados.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, R. S.; JÚNIOR, W. M. D.; MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C.; XAVIER, T. C.; SILVA, A. F.; BARROS, J. S.; PAULA, J. T.; ALMEIDA, T. L. A. C. A importância nutricional da glutamina na fisiologia de matrizes suínas lactantes. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 7, n. 17, 2013.
- CEDDIA, R. B.; GARCIA JÚNIOR, J. R.; CURI, R. In: Metabolismo da glutamina no músculo esquelético. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap. 9, p. 155-161.
- CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 392–397, 2009.
- CURI, R. Considerações preliminares. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap. 1, 15-16.
- DWYER, C. M.; STICKLAND, N. C.; FLETCHER, J. M. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 4, p. 911–917, 1994.
- HYTTEL, P. 2010. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Domestic Animal Embriology**, 1 ed. Elsevier, Berlin, p. 455. cap. 18, p.332-335.
- KIM, J.; SONG, G.; WU, G.; GAO, H.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Arginine, leucine, and glutamine stimulate proliferation of porcine trophectoderm cells through the MTOR-RPS6K-RPS6-EIF4EBP1 signal transduction pathway. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 113, 2013.
- KITT, S. J.; MILLER, P. S.; FISCHER, R. L. Effects of sow dietary glutamine supplementation on sow dietary glutamine supplementation on sow and litter performance subsequent weanling pig performance and intestinal development after an immune challenge. **Nebraska Swine Report**, p. 14-17, 2004.
- MANSO, H. E. C. C. C. **Avaliação da glutamina sintetase e da concentração da glutamina no terço final da gestação e na lactação de camundongos fêmeas e matrizes suínas**. 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C.; DE CARVALHO, L. E.; KUTSCHENKO, M.; NOGUEIRA, E. T.; WATFORD, M. Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 2, 2012.

MANSO FILHO, H. C.; MCKEEVER, K. H.; GORDON, M. E.; COSTA, H. E. C.; LAGAKOS, W. S.; WATFORD, M. Changes in glutamine metabolism indicate a mild catabolic state in the transition mare. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3424-3431, 2008.

OSAVA, C. F. **desempenho produtivo de porcas. 1. efeito do tipo de alojamento na maternidade**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

REEDS, B. P.; BURRIN, D. Glutamine metabolism: nutritional and clinical significance. glutamine and the bowel. **Journal of Nutrition**, v.131: 2505S–2508S, 2001.

SAS STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Software**. Versão 9.2. Cary: SAS Institute, 2002-2008.

SELF, J. T.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; HU, J.; BAZER, F. W.; WU, G. Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1444–51, 2004.

WIGMORE, P. M. C.; STICKLAND, N. C. Muscle development in large and small pig fetuses. **Journal of Anatomy**, v. 137, p. 235–45, 1983.

WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction and health. **Advances Nutrition**, v. 1, p. 31–37, 2010c.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249–1252, 1998.

WU, G. Recent advances in swine amino acid nutrition. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.1, p. 49–61, 2010b.

WU, G.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A. ; KIM, S. W.; LI, X. L.; SATTERFIELD, M. C. ; SPENCER, T. E. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. E195–E204, 2010a.

WU, G.; BAZER, F. W.; JOHNSON, G. A.; KNABE, D. A.; BURGHARDT, R. C.; SPENCER, T. E.; LI, X. L.; WANG, J. J. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 7, p. 2017–30, 2011.

WU, G.; BAZER, F. W.; WALLACE, J. M.; SPENCER, T. E. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2316-2337, 2006.

WU, G.; BAZER, F. W.; WENBIN, T. Developmental changes of free amino acid concentrations in fetal fluids of pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2859–2868, 1995.

WU, G.; POND, W. G.; OTT, T.; BAZER, F. W. Maternal dietary protein deficiency decreases amino acid concentrations in fetal plasma and allantoic fluid of pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 5, p. 894–902, 1998.

YI, G. F.; ALLEE, G. L. **Revisão de literatura: glutamina (Gln) e glutamato (Glu)**, 2004. Disponível em: http://www.lisina.com/upload/Revis%C3%A3o_Glutamina_Glutamato_port.pdf. Acesso em: 06 de julho de 2014.

ZOGNO, M. A. **Aspectos reprodutivos e caracterização colpocitológica do ciclo estral**. 2002. 64 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2002.

CAPÍTULO III

Efeitos da Suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta leitões desmamados sobre a frequência de diarreia, imunidade, histologia intestinal e desempenho até o abate.

5 CAPÍTULO III: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA E L-ÁCIDO GLUTÂMICO NA DIETA LEITÕES DESMAMADOS SOBRE A FREQUÊNCIA DE DIARREIA, IMUNIDADE, HISTOLOGIA INTESTINAL E DESEMPENHO ATÉ O ABATE

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico (1%) na dieta de leitões na creche, provenientes de mães suplementadas durante o final da gestação e lactação. O delineamento experimental foi em blocos considerando o peso e o sexo dos leitões ao desmame, em arranjo fatorial 2x2, sendo um fator a suplementação da mãe e outro a suplementação do leitão do desmame aos 49 dias de idade. Foram avaliados os parâmetros de desempenho (peso, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar), percentual de diarreia na creche e contagem de células intestinais ao desmame e 49 dias de idade; resposta qualitativa na produção de anticorpos contra *Streptococcus suis*, níveis de glutamina e glutamato no plasma sanguíneo e análise econômica. O peso dos leitões ao desmame foi significativo para o fator mãe, evidenciando maior peso para leitões oriundos de mães controles ($p=0,0296$). Houve tendência à significância ($p=0,0522$) para o fator mãe, na conversão alimentar (21 a 34 dias de idade), melhor para os leitões vindos de mães suplementadas. No percentual de diarreia, os leitões oriundos de mães suplementadas apresentaram menor frequência de diarreia entre 34 a 49 dias de idade. Aos 49 e 81 dias de idade, a suplementação mostrou tendência à significância para o fator tratamento ($p=0,0597$) para os níveis de glutamina e glutamato no plasma, revelando maiores concentrações para leitões suplementados. Ao desmame, a contagem de células no íleo foi maior numericamente para os leitões vindos de mães suplementadas na lactação. O desempenho até os 133 dias de idade foi equivalente entre os tratamentos ($p>0,05$). A análise econômica mostrou que suplementar os leitões pode trazer benefícios ao produtor aliado a não diferença quanto aos custos e benefícios quanto à saúde intestinal. Em conclusão, a suplementação pode melhorar a

conversão alimentar de 21 a 34 dias de idade dos leitões, o que pode interferir no desempenho subsequente.

Palavras-chave: Leitão. Glutamina. Glutamato. Histologia. Desempenho.

5.1 INTRODUÇÃO

A inclusão de aminoácidos nas dietas para suínos, considerando os essenciais e não essenciais vem ganhando destaque e atenção na pesquisa por interferirem em inúmeras funções biológicas aliadas ao avanço que vem sendo observado na biologia molecular e na determinação mais acurada obtidas nas técnicas laboratoriais atuais. A exemplo desses fatos, muitos estudos vêm revelando os inúmeros efeitos da glutamina e do glutamato, que desempenham efeitos sinérgicos, na biologia suína (WU et al., 2010; WU et al., 2011; MANSO et al., 2012).

Um dos desafios na suinocultura moderna, é o desmame dos leitões, pois, é um período em que o leitão sofre inúmeros fatores estressantes, como a separação da mãe, a troca da dieta líquida para a sólida, mudança de ambiente e disputas por hierarquia com outros leitões, além de estarem em uma janela de susceptibilidade em relação aos sistemas digestório e imunológico.

As pesquisas buscam intensamente alternativas que amenizem a dificuldade do leitão nesse período para que ele possa ter um bom rendimento e chegar ao final da terminação com seu maior desenvolvimento em peso e conversão alimentar.

Dentre alguns aditivos, os aminoácidos sintéticos, como a glutamina (GLN) e o glutamato (GLU) tem sido utilizados para leitões desmamados. Esses aminoácidos são classificados como não essenciais, mas a glutamina vem ganhando destaque e passou a ser considerada por alguns pesquisadores como condicionalmente essencial, por ser requerida em situações de estresse, catabolismo, injúrias ou doenças (NEWSHOLME et al., 2003; MANSO, 2006).

A glutamina e o glutamato são importantes na geração de energia e reparação da mucosa intestinal (YI; ALLEE, 2004), assim, o GLU pode substituir a GLN facilmente em várias funções, inclusive síntese de aminoácidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). O glutamato

pode ser formado pela enzima glutaminase através da glutamina (DOMENEGHINI et al., 2006).

A L-glutamina tem importante função no intestino, seja na manutenção ou na estrutura (DOMENEGHINI et al, 2006).

Alguns estudos tem demonstrado essa importância, através de resultados com a suplementação de leitões e constatação dos benefícios na manutenção das vilosidades intestinais (AYONRINDE⁹ et al., 1995 apud DOMENEGHINI et al., 2006; WU; KNABE, 1994; WU; MEIER; KNABE et al., 1996; KITT; MILLER; FISCHER, 2003).

Os objetivos do estudo foram avaliar a suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta de primíparas no final da gestação e lactação, aliado a suplementação de leitões pós desmame e os reflexos no desempenho até 133 dias de idade, frequência de diarreia, características qualitativas sobre a resposta vacinal contra *Streptococcus suis* e contagem de células da mucosa intestinal.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão descritas informações sobre os animais, instalações e a metodologia utilizada para obtenção dos resultados encontrados.

5.2.1 Animais e instalações

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (protocolo 2618/2012).

O experimento iniciou com a suplementação de 24 primíparas aos 75 dias de gestação, que continuou durante a lactação (1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico).

⁹ AYONRINDE A.I., WILLIAMS I.H., McCauley R. and Mullan B.P. (1995). Glutamine stimulates intestinal hyperplasia in weaned piglets. In: Manipulating pig production. Hennessey D.P. and Cranwell P.D. (eds). Australasian Pig Science Association. Australia. pp 180-189.

Ao desmame, os leitões foram transferidos para a unidade de creche aos $20,95 \pm 1,89$ dias de idade e distribuídos de acordo com o peso e sexo, totalizando 184 animais, sendo 4/gaiola (Figura 11). Aos 70 dias de idade foram transferidos para a instalação de crescimento e terminação.

A unidade de creche possui gaiolas suspensas, bebedouros do tipo chupeta e comedouros semiautomáticos, com aquecedores a gás. As instalações de crescimento e terminação são providas de lâminas d'água, bebedouros do tipo chupeta e comedouros semiautomáticos.

Figura 11 - Leitões alojados na creche.



Fonte: Parazzi, 2013.

5.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

A unidade experimental considerada foi a baia com 4 leitões, distribuídos ao desmame em blocos de acordo com o peso e sexo. O delineamento foi em arranjo fatorial 2x2, considerando como fatores, a suplementação da mãe ou do leitão, caracterizando 4 tratamentos. As fêmeas foram suplementadas ou não (controle) com 1% de L-glutamina e L-ácido glutâmico na dieta em substituição ao milho, a partir de 75 dias de gestação e lactação, seguindo a mesma proporção para os leitões suplementados ou não, do desmame até 49 dias de idade.

5.2.3 Alimentação

Durante a o período de gestação, as primíparas receberam ração de gestação (2,8kg) e na lactação, ração de lactação, *ad libitum*.

A água e a alimentação foram fornecidas *ad libitum* aos leitões do desmame até os 133 dias de idade. As rações foram preparadas na Fábrica de Ração do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da FMVZ – USP, em Pirassununga-SP. As formulações das rações seguiram as recomendações da Agrocere[®] Multimix.

As rações oferecidas foram (Tabela 20): pré-inicial (do desmame aos 34 dias de idade); inicial I (dos 35 aos 49 dias de idade); inicial II (50 a 70 dias de idade); crescimento (dos 71 aos 110 dias de idade) e terminação (dos 111 aos 133 dias de idade).

Tabela 20 - Ingredientes e níveis nutricionais das dietas pré iniciais: Controle e Tratamento; Iniciais I: Controle e Tratamento, Inicial II, Recria e Terminação

Ingredientes	Controle		Suplementação		Inicial II	Recria	Terminação
	Pré inicial	Inicial I	Pré inicial	Inicial I			
Milho	90,25	119,25	87,75	116,75	171,66	176	186,25
Farelo de soja	52,5	62,5	52,5	62,5	59,75	63,5	53,25
Energipig ¹	7,25	5,75	7,25	5,75	5,75	-	-
Concentrado 40% Avant ²	100	-	100	-	-	-	-
Concentrado 25% Avant ³	-	62,5	-	62,5	-	-	-
Multicreche 50 ⁴	-	-	-	-	12,5	-	-
Núcleo recria ⁵	-	-	-	-	-	10	-
Núcleo terminação ⁶	-	-	-	-	-	-	10
Lisina	-	-	-	-	-	0,500	0,500
Suplementação ⁷	-	-	2,5	2,5	-	-	-
Batida (kg)	250	250	250	250	250	250	250
Níveis Nutricionais							
Matéria Seca (%)	91,58	90,82	91,7	91,33	90,10	89,98	90,29
Matéria Mineral (%)	5,8	5,6	5,99	5,62	6,69	6,21	6,32
Energia bruta	3995	4008	3999,5	4020	3878,5	3849,5	3856,5
Extrato etéreo (%)	4,35	4,49	4,45	4,66	3,62	3,61	3,55
Proteína Bruta (%)	20,5	20,52	21,28	21,21	17,42	16,58	16,5
Cálcio (%)	0,75	0,77	0,75	0,69	0,75	1,03	0,96
Fósforo (%)	0,64	0,65	0,64	0,65	0,50	0,54	0,52

¹**Energipig**: betamananase (min) 2.010.400 u/kg; cálcio (máx) 2.000 mg/kg; cálcio (min) 5.000 mg/kg; extrato etéreo (min) 150g/kg; fibra bruta (máx) 60g/kg; fósforo (min) 3.000 mg/kg; lisina (min) 8.750mg/kg; matéria mineral (máx) 50g/kg; metionina (min) 2.500 mg/kg; proteína bruta (min) 150g/kg; umidade 120 g/kg. ²**Concentrado 40% Avant** fornece (por kg de produto): ác. Fólico (min) 2,93 mg; ác. Fumárico (mín) 19 g; ác. pantotênico (min) 100 mg; biotina (min) 1 mg; cálcio (max) 16, (min) 15,5g; cobalto (min) 0,5 mg; cobre (min) 500 mg; colina (min) 2,900mg; extrato etéreo (min) 20g; ferro (min) 220 mg; fibra bruta (max) 30g; fósforo (min) 10g; iodo (min) 2 mg; lisina (min) 18g; manganês (min) 70mg; matéria mineral (máx) 130g; metionina (min) 7.000 mg; niacina (min) 131,6 mg; proteína bruta (min) 180g; selênio (min) 1mg; sódio (min) 8000 mg; sulfato de colistina 100 mg; umidade (máx) 130g; vit. A 30.000 UI; vit. B1 (min) 14,30 mg; vit. B12 (min) 112,5 mcg; vit. B2(min) 30 mg; vit. B6 (min) 16mg; vit. D3 (min) 8.000 UI; vit. E (min) 330 UI; vit. K3 (min) 25mg; zinco (min) 6.000mg. ³**Concentrado 25% Avant** fornece (por kg de produto): ác. Fólico (min) 3 mg; ác. Fumárico (mín) 24 g; ác. pantotênico (min) 100 mg; biotina (min) 1,23 mg; cálcio (min) 20g e (max) 23,5g; cobalto (min) 0,4 mg; cobre (min) 800 mg; colina (min) 3600 mg; extrato etéreo (min) 20g; ferro (min) 360 mg; fibra bruta (max) 30g; fitase (min) 2000 ftu; fósforo (min) 15,2g; iodo (min) 3 mg; lisina (min) 20,5g; manganês (min) 120mg; matéria mineral (máx) 150g; metionina (min) 9000 mg; niacina (min) 150 mg; proteína bruta (min) 140g; selênio (min) 2mg; sódio (min) 8800 mg; sulfato de colistina 160 mg; umidade (máx) 130 e (min) 10,7; triptofano (min) 2200 mg; valina (min) 7000 mg; vit. A 40.000 UI; vit. B1 (min) 12 mg; vit. B12 (min) 150 mcg; vit. B2(min) 38,2 mg; vit. B6 (min) 20mg; vit. D3 (min) 10.000 UI; vit. E (min) 150 UI; vit. K3 (min) 20mg; zinco (min) 10g. ⁴**Multicreche 50** fornece (por kg de produto): ác. Fólico (min) 12 mg; ác. pantotênico (min) 320mg; biotina (min) 2 mg; cálcio (max) 135g (min) 113,5g; cobre (min) 2500 mg; colina (min) 4.000mg; fósforo (min) 39g; fitase (min) 10.000ftu; iodo (min) 20 mg; lisina (min) 34g; manganês (min) 1.400mg; metionina (min) 12g; niacina (min) 600 mg; selênio (min) 6mg; sódio (min) 35,6g; sulfato de colistina 800 mg; treonina (min) 17g; vit. A 240.000 UI; vit. B1 (min) 40mg; vit. B12 (min) 400 mcg; vit. B2(min) 120mg; vit. B6 (min) 60mg; vit. D3 (min) 40.000 UI; vit. E (min) 900 UI; vit. K (min) 60mg; zinco (min) 3.000mg. ⁵**Recria** fornece (por kg de produto): cálcio (min) 195g/kg, cálcio (máx) 205 g/kg; ác. Fólico (min) 26,7mg/kg; ác. pantotênico (min) 266mg/kg; biotina (min) 1,44mg/kg; cobre (min) 3.250mg/kg mg; cobalto (mín) 4,2m; fósforo (min) 59g/kg; niacina (min) 528 mg/kg; iodo (min) 35mg/kg; manganês (min) 1.000mg/kg; colina (min) 3.750mg/kg; selênio (min) 11,2mg; sódio (min) 59g/kg; ferro (mín) 1.373 mg/kg; vit. A 133.330 UI/kg; vit. B1 (min) 26,66mg/kg; vit. B12 (min) 666,72 mcg/kg; vit. B2(min) 106mg/kg; vit. B6 (min) 48mg/kg; vit. D3 (min) 53.330 UI/kg; vit. E (min) 266,66 UI/kg; vit. K (min) 53,33mg/kg; zinco (min) 2.624 mg/kg. ⁶**Terminação** fornece (por kg de produto): selênio 8 mg; vit.A 93.000 UI; vit B1 13 mg; vit.B12 520 mcg; vit.B2 52,80 mg; vit.B6 13 mg; vit.D3 24.000 UI; vit.E 106 UI; vit.K 53 mg; niacina 426 mg; ácido pantotênico 177 mg; ácido fólico 8 mg; biotina 0,40 mg; cálcio 180 g (min) e 185 g (max); fósforo 48 g; flúor 480 mg; sódio 58,9 g; ferro 948,60 mg; manganês 800 mg; zinco 1949,40 mg; cobre 2.025,00 mg; iodo 28 mg; cobalto 3 mg. ⁷**Suplementação**: 10% L-Glutamina e L-Ácido Glutâmico.

Fonte: Agrocere[®], 2014.

5.2.4 Desempenho

No desmame aos $20,95 \pm 1,89$ dias de idade, os leitões foram pesados (Toledo do Brasil, modelos 2124/1 e modelo MGR 3000) e distribuídos na creche, seguindo-se as pesagens e controle do consumo nas mudanças das rações. Assim, as faixas de consumo médio diário de ração (CMDR) em kg/animal/dia, ganho médio diário de peso (GMDP) em kg/animal/dia e conversão alimentar (CA) consideradas: dos 21 aos 34 dias; 35 aos 49 dias; 50 aos 69; 70 a 110 e 111 a 133 (abate).

5.2.5 Frequência de diarreia

Diariamente, dos $20,95 \pm 1,89$ aos 70 dias de idade, foi avaliado o escore das fezes, observado em todas as unidades experimentais e considerando os escores: 1 para fezes normais, 2 para pastosas e 3 para líquidas. Os animais que apresentaram escores 2 ou 3, foram considerados com diarreia. Os períodos avaliados foram de 21 a 34, 35 a 49 e 50 a 70 dias de idade.

5.2.6 Resposta vacinal

Foi realizado um acompanhamento dos parâmetros imunológicos, através da detecção de anticorpos contra *Streptococcus suis*, cujos leitões foram vacinados com 2 mL via intramuscular (Porcilis® Strep suis, Intervet). Os 10 leitões, escolhidos aleatoriamente em cada tratamento (totalizando 40 leitões), receberam a primeira dose com 45 dias de idade e o reforço 21 dias depois.

Foram colhidas amostras de sangue da veia cava cranial para obtenção do soro, que foram congeladas imediatamente a -20°C para posterior análise, no dia da primeira dose (45 dias de idade) e 15 dias após o reforço (81 dias de idade).

Para a realização da análise pela metodologia em ELISA, foram utilizados anticorpos do kit Antibody ELISA Test Kit – Green Spring.

5.2.7 Níveis de glutamina e glutamato no plasma

Ao abate dos leitões, no desmame e aos 49 dias de idade, foram colhidas amostras de sangue para obtenção do plasma. Além disso, nos mesmos dias das colheitas para a verificação da resposta vacinal (45 e 81 dias de idade), o plasma também foi colhido e todas as amostras foram congeladas a -80°C .

A contenção dos animais para a colheita de sangue foi realizada com contenção manual (45 dias de idade), com o leitão em decúbito dorsal ou com o auxílio do cachimbo e através de punção da veia jugular com seringa de 10 mL e agulha 40 x 12 gauges.

Para avaliações dos níveis de glutamina, 5 mL da amostra de sangue coletado, foi transferido imediatamente para tubos com anticoagulante, para obtenção do plasma sanguíneo. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. O plasma foi obtido e armazenado em eppendorfs de 2 mL, os quais foram congelados a -80°C para posterior preparação das amostras e análises dos níveis de glutamina e glutamato.

A preparação das amostras para avaliação da glutamina e glutamato foi descrita por Manso (2006). Para isso, foram pesados os tubos vazios de 4 mL (TV), os pesos anotados e identificados de acordo com os animais. Em eppendorfs de 2 mL, foram colocados 1 mL de ácido perclórico (PCA) a 10% e 1 mL do plasma anteriormente congelado e homogeneizado. As amostras permaneceram em repouso por 5 minutos refrigeradas. Após esse período foram centrifugadas a 3,000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para os tubos de 4 mL previamente pesados, e pesado novamente, sendo o peso anotado (Balança SHIMADZU, mod AY220). Foram adicionadas às amostras 2 gotas de indicador de pH (pH-Indicator Solution, Universal Incicator, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Em seguida, as amostras foram neutralizadas com hidróxido de potássio (KOK 1M). Assim, os tubos foram novamente pesados e os pesos anotados. Após esses procedimentos as amostras foram congeladas a -20°C para análise no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal (BIOPA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob a responsabilidade da professora Dra. Helena Emília C.C.C. Manso.

Inicialmente, 0,20 mL da amostra desproteïnizada e neutralizada foi misturada a 0,25 mL de água, 0,50 mL de acetato de sódio (0,5 M, pH 5) e 0,05 mL de glutaminase (SIGMA – ALDRICH G8880–10 unidades). A solução foi homogeneizada e colocada para incubação no banho maria a 37° C por 1 hora, para que ocorresse a conversão da glutamina em glutamato nas condições ideais.

Após a incubação, 0,5 mL da amostra foi misturado a 1,5mL de solução tampão (TRIS 0,2 M, 1,5 mL de água, 0,3 mL de hidrazina e 0,09 mM de NAD⁺). Essas amostras preparadas em cubetas foram lidas em espectrofotômetro a 340 nm (Spectrum Meter SP-2000UV). Após a leitura, a desidrogenase glutâmica (SIGMA - ALDRICH G2626–50MG) foi acrescentada (0,2mL) e uma nova leitura no espectrofotômetro foi realizada após 30 minutos.

A diferença entre as leituras foram as quantidades de glutamina e glutamato e o total de glutamato. A concentração de glutamina foi obtida através da subtração entre o total e glutamato e o total de glutamina e glutamato.

5.2.8 Análise histológica

Ao desmame, 6 leitões oriundos de fêmeas do grupo suplementadas e 6 do grupo controle foram escolhidos aleatoriamente e sacrificados. Aos 49 dias de idade, foram colhidos de 4 animais/tratamento escolhidos aleatoriamente.

Após a insensibilização por eletronarcese, realizou-se a sangria e a coleta dos segmentos do duodeno (10 cm a partir do piloro), jejuno (porção média), íleo (10 cm do ceco) e cólon.

Para a contagem das células da mucosa, os tecidos descritos acima foram colhidos, de modo transversal e 0,5 cm² foi fixado em líquido fixador Metacarn por 24 horas e após incluídos em parafina. Foram realizados cortes transversais ao maior eixo do intestino de 5 µm de espessura.

A quantificação do número de células foi realizada no material previamente incluído em parafina. Os cortes histológicos foram submetidos à reação histoquímica do ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS), com coloração de fundo pela hematoxilina (BANCROFT; GAMBLE, 2002). Foram feitos cinco cortes histológicos não sequenciais de cada animal, medidas pelo software de análise de imagens Axiovision Zeiss com uma objetiva de 40x. Para

a contagem foram incluídos nas fotos, 5 frames de modo aleatório para contagem de células dentro do frame (155x155 μm) e a média assim obtida, dos 5 frames correspondentes a cada foto (25) para cada segmento, corresponde à contagem das células.

As análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia Macroscópica e Imuno-histoquímica do Dep. de Cirurgia da FMVZ/USP sob responsabilidade do professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez.

5.2.9 Análise econômica

A análise econômica baseou-se no consumo de ração dos leitões em cada um dos tratamentos.

As fórmulas utilizadas para os cálculos de cada tratamento foram as seguintes:

- Receita total por tratamento (RTT) = (Σ (peso individual ao abate x preço kg vivo))
- Custo total da dieta por tratamento (CTDT) = (custo da ração + custo do aditivo)

E, a partir destes valores foram calculados:

- Margem bruta do lote (MB) = RTT - CTDT
- Relação custo dieta/receita total (Re) = CTDT/RT
- Participação do custo da suplementação sobre o custo total da dieta (PAD) = custo da suplementação/custo da dieta
- Participação do custo da suplementação sobre a receita total (PAR) = custo da suplementação/receita total

Para a obtenção do preço do suíno vivo/kg, e para o cálculo do custo da dieta, foi realizado um levantamento de uma série histórica de dez anos, mês a mês, (de outubro de 2003 até setembro de 2013) dos preços médios praticados no estado de São Paulo (IEA-SP, 2013), então utilizando o Índice Nacional de Preços (INPC) (IBGE, 2013), mês a mês, durante o mesmo período, os preços do suíno vivo/kg, do milho e do farelo de soja 47%, foram deflacionados tendo como mês base setembro de 2013.

O restante dos valores utilizados para o cálculo do custo da dieta foram obtidos diretamente com o fornecedor dos produtos (Agroceres[®] Multimix) no estado de São Paulo, os valores referem-se aos preços praticados no mês de novembro de 2013.

5.2.10 Análise estatística

As premissas da análise estatística foram verificadas quanto à normalidade dos resíduos, pelo teste do Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e homogeneidade das variâncias. As variáveis que não respeitaram as premissas foram transformadas para a função logaritmo a fim de tornar os dados mais homogêneos, ou seguiu-se para a estatística não-paramétrica, pelo teste de Wilcoxon.

As variáveis de desempenho dos leitões foram submetidas à análise de variância (ANOVA), em esquema fatorial 2x2, sendo um fator a suplementação da mãe e outro, a suplementação do leitão.

Os dados referente à frequência de dias com diarreia (escores 1 ou 2), e os dados do percentual de animais positivos ao *Streptococcus suis* foram analisados pelo procedimento PROC GLIMMIX.

As concentrações de glutamina nos abates e a contagem de células no intestino foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e as variáveis que não respeitaram as premissas da análise estatística foram transformadas em função logaritmo. As concentrações de glutamina e glutamato aos 45 e 81 dias de idade dos leitões foram submetidas a análise de variância (PROC MIXED) adicionado de medidas repetidas no tempo.

Para tanto, o programa SAS 9.2 (2002-2008) foi utilizado para as análises. O nível de significância considerado foi de 5%.

5.3 RESULTADOS

A análise dos valores referente aos pesos dos leitões no desmame revelou valor significativo para o fator mãe ($p=0,0296$), evidenciando maior peso dos leitões oriundos de mães controles (Tabela 21). Contudo, nas demais idades, os valores independente de mãe suplementada ou não, foram semelhantes. Os valores na conversão alimentar (Tabela 24) mostraram no período de 21 a 34 dias tendência a significância para o fator Mãe ($p=0,0522$), indicando melhor conversão alimentar para os leitões oriundos de mãe suplementada. Nos demais períodos não foram detectadas diferenças.

Nas variáveis ganho de peso médio diário e consumo médio diário de ração (Tabelas 22 e 23), não houve significância em nenhum dos períodos analisados, para nenhum fator ou interação entre eles (mãe x leitão).

Tabela 21 - Valores médios e erro padrão do peso dos leitões (kg), no desmame aos 21 dias, aos 35, 50, 70, 110 e 133 dias de idade

Idade (dias)	Mãe Suplementada		Mãe Controle		Probabilidades		
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão	Mãe	L*M
21	5,20 ± 0,27	5,15 ± 0,21	5,67 ± 0,22	5,68 ± 0,23	0,8998	0,0296	1,0000
35	7,79 ± 0,42	7,81 ± 0,29	8,21 ± 0,37	8,06 ± 0,36	0,8392	0,3587	0,8430
50	14,92 ± 0,75	14,31 ± 0,45	15,14 ± 0,49	14,66 ± 0,42	0,2904	0,5275	1,0000
70	25,63 ± 1,41	25,74 ± 0,85	27,22 ± 0,98	26,63 ± 0,75	0,7770	0,2267	0,7638
110	67,75 ± 2,31	66,47 ± 1,22	68,64 ± 1,83	68,79 ± 1,43	0,7171	0,3515	0,7111
133	93,40 ± 2,37	90,29 ± 1,36	93,98 ± 2,37	94,58 ± 2,14	0,5184	0,2396	0,4000

Fonte: Parazzi, 2013.

Tabela 22 - Valores médios e erro padrão do consumo de ração do desmame aos 34, 35 a 49, 50 a 70, 71 a 110 e 111 a 133 dias de idade dos leitões

Idade (dias)	Mãe Suplementada		Mãe Controle		Probabilidades		
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão	Mãe	L*M
21 a 34	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,6237	0,5171	0,2543
35 a 49	0,82 ± 0,05	0,86 ± 0,05	0,82 ± 0,05	0,75 ± 0,05	0,8289	0,2683	0,3411
50 a 70	1,29 ± 0,06	1,25 ± 0,04	1,38 ± 0,05	1,31 ± 0,06	0,2755	0,1430	1,0000
71 a 110	2,38 ± 0,10	2,31 ± 0,07	2,41 ± 0,07	2,38 ± 0,09	0,5400	0,5407	0,8730
111 a 133	3,11 ± 0,09	2,93 ± 0,09	3,05 ± 0,14	3,19 ± 0,16	0,8437	0,4238	0,1916
total	2,88 ± 0,09	2,69 ± 0,09	2,79 ± 0,13	2,96 ± 0,16	0,8945	0,4640	0,1391

Fonte: Parazzi, 2013.

Tabela 23 - Valores médios e erro padrão do ganho de peso médio diário no desmame, entre 21 e 34, 35 e 49, 50 a 70, 71 a 110 e 111 a 133 dias de idade dos leitões

Idade (dias)	Mãe Suplementada		Mãe Controle		Probabilidades		
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão	Mãe	L*M
21 a 34	0,193 ± 0,02	0,196 ± 0,01	0,186 ± 0,01	0,176 ± 0,01	0,8748	0,3314	0,6584
35 a 49	0,507 ± 0,03	0,469 ± 0,02	0,502 ± 0,02	0,481 ± 0,02	0,1478	0,7694	0,7294
50 a 70	0,618 ± 0,04	0,619 ± 0,03	0,648 ± 0,03	0,652 ± 0,03	0,9890	0,3433	0,9353
71 a 110	1,032 ± 0,04	0,996 ± 0,03	1,016 ± 0,03	1,031 ± 0,03	0,7090	0,7521	0,3963
111 a 133	1,085 ± 0,02	1,013 ± 0,04	1,088 ± 0,04	1,100 ± 0,05	0,4247	0,2528	0,3058
total	0,801 ± 0,01	0,774 ± 0,01	0,802 ± 0,02	0,808 ± 0,02	0,5142	0,3242	0,3818

Fonte: Parazzi, 2013.

Tabela 24 - Valores médios e erro padrão da conversão alimentar de 21 aos 34, 35 a 49, 50 a 70, 71 a 110 e 111 a 133 dias de idade dos leitões

Idade (dias)	Mãe Suplementada		Mãe Controle		Probabilidades		
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão	Mãe	L*M
21 a 34	1,17 ± 0,02	1,24 ± 0,04	1,32 ± 0,06	1,26 ± 0,05	0,9469	0,0522	0,1750
35 a 49	1,62 ± 0,12	1,85 ± 0,09	1,65 ± 0,12	1,54 ± 0,10	0,5378	0,1901	0,1575
50 a 70	2,15 ± 0,09	2,06 ± 0,09	2,15 ± 0,07	2,09 ± 0,16	0,4539	0,8247	1,0000
71 a 110	2,31 ± 0,07	2,34 ± 0,07	2,39 ± 0,07	2,31 ± 0,07	0,7199	0,6919	0,4585
111 a 133	2,87 ± 0,07	2,95 ± 0,13	2,82 ± 0,09	2,91 ± 0,07	0,3843	0,5945	1,0000
total	2,30 ± 0,13	2,31 ± 0,17	2,30 ± 0,15	2,29 ± 0,29	0,9454	0,8977	0,8258

Fonte: Parazzi, 2013.

Em relação ao escore fecal (Tabela 25), dos 21 aos 34 dias de idade dos leitões, houve interação entre os fatores Mãe e Leitão, onde os tratamentos, leitão controle (Mãe suplementada) e leitão suplementado (Mãe suplementada) apresentaram maior percentual de diarreia.

No período de 35 a 49 dias houve efeito de Leitão, os leitões suplementados apresentaram maior percentual, e efeito Mãe, onde os leitões de mães controle apresentaram maior percentual, ou seja, nessa fase a suplementação da mãe foi melhor na diminuição do percentual de diarreia no período.

No último período (50 a 70 dias de idade), em que não há mais suplementação via ração, houve interação entre os fatores Mãe e Leitão, evidenciando que se não tratar o leitão, seria melhor tratar a mãe para controlar a diarreia.

Tabela 25 - Valores médios e erro padrão, dos percentuais de animais que apresentaram diarreia dos 21 aos 34, 35 a 49 e 50 a 70 dias de idade dos leitões

Idade	Mãe suplementada		Mãe controle		Probabilidades		
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão	Mãe	L*M
21-34	37,46 ^a ± 3,29	25,50 ^b ± 3,30	26,81 ^b ± 3,33	30,91 ^a ± 3,30	0,0115	0,1086	<.0001
50-70	34,83 ^a ± 1,89	16,48 ^b ± 1,94	26,21 ^a ± 1,91	22,08 ^b ± 1,93	<.0001	0,7444	<.0001
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Mãe Suplementada	Mãe Controle			
35-49	42,06 ^a ± 1,42	35,84 ^b ± 1,43	35,70 ^B ± 1,43	42,21 ^A ± 1,43	0,0001	<.0001	0,7718

Médias com letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste LSD.

Fonte: Parazzi, 2013.

A tabela 26 apresenta os resultados quanto ao percentual de animais com anticorpos positivos para *Streptococcus suis*.

Tabela 26 - Valores médios e erro padrão, da porcentagem de animais que apresentaram anticorpos contra *Streptococcus suis* no dia da 1ª dose da vacina e 36 dias após

Idade	Mãe Suplementada	Mãe Controle
45	50,87 ± 7,55 ^{aA}	9,70 ± 9,08 ^{bA}
81	20,63 ± 7,99 ^{aA}	26,75 ± 7,84 ^{aA}

Médias com letras minúsculas diferentes diferem entre si na horizontal e maiúsculas na vertical pelo teste LSD. Fonte: Parazzi, 2013.

O plasma dos leitões foi colhido ao desmame, para verificação da concentração de glutamina e glutamato no plasma, sem diferenças estatísticas (Tabela 27).

Tabela 27 - Médias e erro padrão das concentrações de glutamina e glutamato (G+G) no plasma (µmol/mL) dos leitões abatidos ao desmame

	Tratamentos		Probabilidade
	Mãe Suplementada	Mãe Controle	
G+G	0,5118 ± 0,05	0,4985 ± 0,07	0,8357

Fonte: Parazzi, 2013.

A tabela 28 apresenta os valores, aos 49 dias de idade dos leitões, da concentração de glutamina e glutamato no plasma, sem diferenças significativas.

Tabela 28 - Médias e erro padrão das concentrações de glutamina e glutamato (G+G) no plasma (µmol/mL) dos leitões aos 49 dias de idade

	Mãe Suplementada		Mãe Controle		Probabilidades		
	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão	Mãe	Interação
	G+G	0,545 ± 0,12	0,698 ± 0,22	0,552 ± 0,08			

Fonte: Parazzi, 2013.

As concentrações de glutamina e glutamato no plasma também foram analisadas nos dias das coletas de sangue para avaliação da imunidade (45 e 81 dias de idade), como mostra a tabela 29.

Na avaliação da concentração de glutamina e glutamato aos 45 e 81 dias de idade verificou-se tendência para o fator tratamento ($p=0,0597$), evidenciando a maior concentração aos 45 dias de idade para leitões suplementados, independente da mãe. Aos 81 dias de idade, correspondendo já na fase de crescimento dos animais, a suplementação havia terminado, os valores para a concentração de glutamina e glutamato foram muito próximos, embora ligeiramente maiores para o grupo suplementado.

Tabela 29 - Médias e erro padrão das concentrações de glutamina e glutamato ($\mu\text{mol/mL}$) e desvios padrão no plasma dos leitões aos 45 e 8 dias de idade

Idade	Mãe Suplementada		Mãe controle	
	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado
45	0,555 \pm 0,13	0,640 \pm 0,05	0,501 \pm 0,03	0,638 \pm 0,03
81	0,517 \pm 0,03	0,536 \pm 0,04	0,544 \pm 0,06	0,590 \pm 0,04

Probabilidades: Leitão $p=0,0597$; Mãe $p=0,8039$; Mãe x Leitão $p=0,6361$; tempo $=0,4014$.
Fonte: Parazzi, 2013.

Na contagem de células intestinais ao desmame (Tabela 30), não houve diferença em nenhum dos segmentos analisados. Contudo, observamos que o número de células no íleo dos leitões oriundos de mães suplementadas foi maior em relação às mães não suplementadas.

Tabela 30 - Médias da contagem de células da mucosa e erro padrão ao desmame no duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso (IG) dos leitões abatidos

Intestino	Mãe suplementada	Mãe controle	Probabilidade
Duodeno	32,84 \pm 2,05	33,46 \pm 4,93	0,9095
Jejuno	26,95 \pm 2,33	26,85 \pm 1,90	0,9759
Íleo	40,31 \pm 2,97	34,09 \pm 3,64	0,2226
IG	39,00 \pm 4,04	37,50 \pm 6,28	0,8448

Fonte: Parazzi, 2013.

Analisando a estimativa das variâncias entre os tratamentos, através do “teste F”, para a contagem de células no duodeno verificou-se tendência a estimativa das variâncias ($p=0,0764$) no grupo suplementado para a menor variabilidade comparando com o controle (desvios padrão 5,01 e 12,07, respectivamente). As demais variáveis, jejuno, íleo e intestino grosso não foram significativas em relação às variabilidades ($p>0,05$).

No abate aos 49 dias de idade, também não foi possível observar efeitos significativos, nem a interação entre os fatores mãe e leitão (Tabela 31). Nessa idade os animais já estavam adaptados ao novo ambiente e principalmente ao novo tipo de ração.

Tabela 31 - Médias da contagem de células e erro padrão aos 49 dias de idade dos leitões aos 49 dias de idade duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso (IG)

Intestino	Mãe suplementada		Mãe controle		Probabilidades		
	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão Suplementado	Leitão Controle	Leitão	Mãe	L*M
Duodeno	37,49 ± 1,99	40,67 ± 1,77	37,43 ± 4,03	44,18 ± 4,04	0,1410	0,5949	0,5823
Jejuno	32,56 ± 2,10	36,17 ± 4,30	31,84 ± 2,23	32,06 ± 1,40	0,5106	0,4155	0,6082
Íleo	39,73 ± 0,92	41,92 ± 2,12	43,63 ± 5,91	36,87 ± 2,45	0,5344	0,7004	0,2236
IG	42,47 ± 3,25	47,28 ± 5,39	44,98 ± 2,54	44,05 ± 4,55	0,6434	0,9321	0,4960

Fonte: Parazzi, 2013.

Para as variabilidades da contagem de células aos 49 dias, os efeitos mãe e leitão foram analisados separadamente. Apenas o fator mãe apresentou significância. A contagem de células no íleo foi significativa ($p<0,0141$), o grupo dos leitões oriundos de mães suplementadas apresentaram menor variabilidade em relação aos leitões de mães controles (desvio padrão de 3,25 e 9,12, respectivamente). Houve tendência em relação à variabilidade no duodeno ($p=0,0630$) em que o grupo de leitões de mães suplementadas apresentaram menor variabilidade em relação ao grupo de mães controles (desvio padrão 3,88 e 8,30, respectivamente).

A Tabela 32 apresenta os resultados obtidos para a receita total por tratamento, custo total da dieta por tratamento, margem bruta do lote, relação custo dieta/receita total, participação do custo da suplementação sobre o custo total da dieta e participação do custo da suplementação sobre a receita total. Os valores consideraram os leitões suplementados ou não.

Tabela 32 - Receitas e Custos dos animais suplementados e não suplementados

	Unidade	Leitões Suplementados	Leitões Controle	Probabilidade
Receita Total por Tratamento (RTT)	R\$	9094,80	8962,58	0,1975
Custo Total da dieta por tratamento (CTDT)	R\$	3820,65	3719,55	0,1877
Margem Bruta do lote (MB) ¹	R\$	5274,15	5243,03	0,6444
Relação custo dieta/receita total (Re)	%	42,01%	41,50%	-
Custo da Suplementação	R\$	36,80	0,00	-
PAD	%	0,963%	0%	-
PAR	%	0,405%	0%	-

¹Para o cálculo da margem bruta considerou-se apenas o custo da dieta; *probabilidade. Fonte: Parazzi, 2013.

Para as variáveis RTT, CTDT e MB, a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Os custos das dietas em relação às receitas totais mostraram-se muito próximos um do outro, sendo o diferencial de apenas 0,49% entre os custos, revelando assim um baixo impacto da suplementação sobre a receita total obtida do lote.

5.4 DISCUSSÃO

Ao desmame, os leitões geralmente sofrem inúmeros desafios, sejam eles ambientais, nutricionais e/ou imunológicos, sendo por essa razão fruto de inúmeras pesquisas na tentativa de amenizar ou melhorar seus efeitos.

A glutamina sendo fonte de energia para células de intensa renovação celular, como o caso das células do sistema imune e do sistema entérico, também possui importância sendo precursora dos nucleotídeos (ABREU et al., 2010), destacando-se mais que a glicose (PALANCH, 2000).

Durante o aleitamento, no desmame e em situações de injúrias intestinais as demandas por glutamina são maiores (LOBLEY; HOSKIN, MCNEIL, 2001).

O glutamato pode substituir a glutamina na geração de energia e na síntese de aminoácidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). A absorção da glutamina é feita pelos enterócitos, sendo transportada através do sistema transportador de nitrogênio dependente de sódio e liberada no sangue pelo sistema porta (SOUBA et al., 1990). Vários estudos têm demonstrado os efeitos da suplementação com glutamina e/ou glutamato no pós desmame de leitões, mas poucos acompanharam os animais até a época do abate.

Neste estudo, o peso ao desmame dos animais foi significativo para o efeito Mãe ($p=0,0292$), e mostrou que os leitões nascidos de mães que não receberam a suplementação ao desmame foram mais pesados. Contudo no período de 21 a 34 dias de idade, o mesmo fator Mãe mostrou tendência à significância ($p=0,0522$) no parâmetro conversão alimentar, revelando que embora os animais oriundos de mãe controle tenham desmamado mais pesados, nessa primeira etapa importante da creche até os 34 dias de idade. Nessa primeira fase, além de todos os fatores estressantes para o leitão, onde o consumo é alterado, com reflexo na perda de peso, tal diferencial no peso, no próximo período (34 dias), já não mostra nenhum fator significativo, mantendo-se até os 133 dias de idade, quando se observa semelhança entre os tratamentos.

Numericamente, quando avaliamos o período total de desempenho e mesmo que os animais controles de mães controles tenham um peso ligeiramente maior, ao abate consumiram mais ração no período de 111 a 133 dias de idade e que refletiu numericamente em valores maiores de consumo no período total (2,96 versus 2,88, 2,69 e 2,79 kg diários, nos grupos Mãe e Leitões controles, Mãe e Leitões suplementados, Mãe suplementada e Leitões Controle; Mãe controle e Leitões suplementados), revelando conversão alimentar e ganho de peso equivalentes aos outros tratamentos, o que poderia representar em maior custo pelo maior consumo de ração.

Os resultados discordam dos encontrados por Kitt, Miller e Fischer (2004) que ao suplementaram porcas com 2,5% de glutamina, não encontraram diferenças no peso dos leitões ao desmame. Domeneghini et al. (2004) não encontraram diferenças no desempenho de leitões desmamados durante 28 dias, suplementando-os com 0,5% de glutamina ou glutamina com nucleotídeos. Da mesma forma, Manso et al. (2012) também não encontraram diferenças no peso ao desmame de leitões oriundos de mãe suplementadas com glutamina ou glutamina e glutamato.

Abreu et al. (2010), não encontraram melhor conversão alimentar em leitões suplementados com glutamina (1,0%) ou associada ao plasma, para leitões desmamados.

Kitt, Miller e Fischer (2003), suplementaram leitões desmamados com 5% de L-glutamina, não encontrando diferenças no desempenho na primeira semana pós desmame. No desafio com LPS (endotoxina produzida por *E. coli*) ou solução fisiológica, os leitões que receberam L-glutamina na dieta não apresentaram diferenças, com ou sem desafio. Além de ser fonte de energia para os enterócitos, os autores concluíram que a glutamina é também essencial em situações em que o sistema imune é desafiado. Os resultados levaram os autores a concluir que a suplementação foi essencial em condições de estresse imunológico.

O percentual de diarreia dos leitões mostrou aspectos interessantes, no período de 21 a 34 dias de idade, pois, se suplementarmos os leitões não há necessidade de suplementar a mãe, já se não suplementarmos a mãe, é melhor suplementar os leitões para controlar a diarreia nessa fase.

No período de 35 a 49 dias, houve interação, mostrando que a suplementação dos leitões foi mais eficiente, se a mãe não for suplementada. No último período, os leitões controles, oriundos de mães suplementadas apresentaram o menor percentual de diarreia, nos conduzindo a refletir que a suplementação das mães possa trazer benefícios para a integridade intestinal dos leitões nessa fase, levando ao aumento no consumo numa fase crítica do animal representado pela primeira semana pós desmame.

Suplementar a mãe é importante no controle da diarreia, destacando a importância da suplementação durante a lactação para as fêmeas.

Lee et al. (2003) não encontraram influências da glutamina na ocorrência de diarreia, suplementando leitões desmamados com vários percentuais de glutamina na dieta (0, 0.5, 1.0, ou 1.5%). Zou et al. (2006) suplementaram leitões desmamados com 1% de glutamina durante 20 dias após o desmame, e observaram que os casos de diarreia foram menos intensos, os autores comentam que a glutamina pode ter acelerado a renovação celular da mucosa intestinal. Nos primeiros 10 dias de experimentação, os leitões suplementados apresentaram melhor conversão alimentar em comparação ao grupo controle. Os resultados corroboram com os achados nesse estudo, em que os animais oriundos de mães suplementadas mostraram tendência a significância, com melhor conversão alimentar para o grupo de leitões de mães suplementadas. Já nos próximos 10 dias os mesmos pesquisadores, relataram maior ganho de peso para os leitões suplementados.

A concentração de glutamina e glutamato no plasma dos leitões ao desmame e 49 dias de idade, não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, do desmame aos 34 dias de idade, a conversão alimentar dos leitões oriundos de mães suplementadas foi melhor, e após esse período os resultados do desempenho sugerem que a suplementação teve alguma influência, pois, mesmo iniciando o período de creche um pouco mais leves, ao final do período de terminação, todos os tratamentos foram equivalentes.

Kitt, Miller e Fischer (2004) e colaboradores relataram que a concentração de glutamina nos leitões ao desmame não foi significativa, sugerindo que os aumentos encontrados no leite e no plasma das porcas tiveram pouca influência no desempenho dos leitões.

As concentrações de glutamina e glutamato foram significativas nas colheitas aos 45 e 81 dias de idade dos leitões e mostraram tendência para o fator tratamento ($p=0,0597$), evidenciando superioridade para os leitões suplementados. Contudo aos 81 dias de idade, embora ligeiramente maiores para os leitões suplementados, os níveis dos leitões suplementados caem, pois, a suplementação cessou aos 49 dias.

Algumas pesquisas têm relatado efeitos positivos em relação à altura de vilosidades e profundidade das criptas, principalmente nessa fase pós desmame em que os efeitos no sistema digestório podem afetar o desenvolvimento dos leitões, pois, podem alterar a absorção dos nutrientes (WU; MEIER; KNABE, 1996; KITT; MILLER; FISCHER, 2003; DELL'ORTO; GIANCAMILLO; SAVOINI, 2002; ABREU et al., 2010). A atrofia das vilosidades no desmame pode estar relacionada a perda celular ou diminuição na renovação destas (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), o que pode afetar a absorção dos nutrientes e conseqüentemente o desempenho dos leitões.

A glutamina também estimula a proliferação celular (purinas e primidinas) (SOUBA et al., 1990; FRANCISCO et al., 2002), e a síntese de nucleotídeos são vias importantes na utilização de glutamina e glutamato (WU, 1998).

Caldara et al., (2010) suplementaram 1% de glutamina para leitões até 46 dias de vida, sobre a taxa de turnover de carbono na mucosa intestinal, e verificaram que a glutamina acelera o processo de renovação da mucosa intestinal.

A contagem de células calciformes no íleo mostrou resultados interessantes, embora não significativos, valor numérico maior para os leitões vindos de mães suplementadas ao desmame. Nesse mesmo período do desmame, a estimativa das variâncias significativa para a

contagem de células no duodeno ($p=0,0764$), evidenciou melhor homogeneidade dos animais oriundos de mães suplementadas durante a lactação.

Aos 49 dias de idade, os animais já estão melhor adaptados às adversidades, do período crítico pós desmame e por isso talvez não tenha havido nenhum efeito da suplementação para a contagem de células.

As variabilidades das médias analisadas sobre a contagem de células aos 49 dias, no íleo foram significativas (0,0141), o grupo dos leitões oriundos de mães suplementadas apresentou menor variabilidade em relação aos leitões de mães controle, além disso, houve valor próximo a significância das estimativas das variâncias no duodeno, favorável ao grupo de leitões de mães suplementadas.

Domeneghini et al. (2004) avaliaram o íleo de leitões recebendo 0,5% de glutamina ou glutamina e nucleotídeos após 28 dias do desmame, e encontraram aumento nas vilosidades e criptas mais profundas. Esses achados também foram positivos nas células mitóticas da mucosa e na diminuição da apoptose celular.

Em um estudo realizado em humanos, avaliando glutamina e L-alanyl L-glutamina, os autores verificaram que os tratamentos foram bons indutores na proliferação de células da mucosa do íleo e do cólon (SCHEPPACH¹⁰, et al., 1994, citados por PALANCH, 2000).

Esses resultados sugerem a ligação da glutamina com a proliferação e renovação celular no intestino, o que pode ter ocorrido nos resultados encontrados na contagem de células do íleo de animais oriundos de mães suplementadas, embora não tenha havido significância.

Cabrera et al., (2013) utilizaram Aminogut[®], glutamina e dieta controle para leitões antes e após o desmame, e avaliaram o intestino dos animais com 1 semana após o desmame. Os animais suplementados com Aminogut[®] mostraram maior profundidade das criptas, explicando os autores, que a glutamina doa seu grupo amina para a síntese de purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina e citosina), que são as bases para a produção do DNA para células de desenvolvimento rápido, como é o caso das células na cripta.

Economicamente, não houve diferenças entre suplementar ou não, que é principalmente, importante quando a dieta possui aditivos ou suplementos. Contudo, associando os resultados dos outros parâmetros e não havendo influências negativas no

¹⁰ SCHEPPACH, W. LOGES, C., BARTRAM, P., CHRISTL,S.U., RICHTER, F., DUSEL, G., FUERST, P., KASPER, H. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterology* 107:429-34, 1994.

aumento dos custos pela suplementação, podemos inferir que a utilização da glutamina pode trazer vantagens no período crítico pós desmame, a destacar a melhor conversão alimentar encontrada no período de 21 a 34 dias de idade.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação com L-glutamina e L-ácido glutâmico, melhorou a conversão alimentar após o desmame, dos 21 a 34 dias. Aliado a suplementação das porcas durante a lactação, pode haver melhoras que refletem na integridade da mucosa intestinal através dos resultados encontrados na homogeneidade em relação a contagem de células caliciformes.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. L. T.; DONZELE, J. L.; SARAIVA, A.; OLIVEIRA, R. F. M.; FORTES, E. I.; GRAÑA, G. L. Glutamina, nucleotídeos e plasma suíno em rações para leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 520–525, 2010.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. London: Churchill Livingstone, 2002. 662 p.
- CABRERA, R. A.; USRY, J. L.; ARRELLANO, C.; NOGUEIRA, E.; KUTSCHENKO, M.; MOESER, A. J.; ODLE, J. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2013.
- CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; GARCIA, R. G.; FERREIRA, V. M. O. S. Glutamina e turnover do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2664-2669, 2010
- PALANCH, A. C. Metabolismo da glutamina no intestino. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap 4, p. 85-96.
- DELL'ORTO, V.; DI GIANCAMILLO, A.; SAVOINI, G. Influence of nucleotides and glutamine dietary supplementation on gut health of weanling piglets. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 1, p. 220, 2002.
- DOMENEGHINI, C.; DI GIANCAMILLO, A.; ARRIGHI, S.; BOSI, G. Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism: state of the art in the pig, and perspectives towards humans. **Histology and Histopathology**, v. 21, n. 3, p. 273–83, 2006.
- DOMENEGHINI, C.; DI GIANCAMILLO, A.; SAVOINI, G.; PARATTE, R.; BONTEMPO, V.; DELL'ORTO, V. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period: an histochemical and histometrical study. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 49–58, 2004.
- FRANCISCO, T. D.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R.; GARCIA JÚNIOR, J. R. Glutamina: metabolismo, destinos, funções e relação com o exercício físico. **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**, v. 6, n. 1, p. 81-88, 2002.

KITT, S. J.; MILLER, P. S.; FISCHER, R. L. Effects of glutamine on growth performance and intestinal development of immune challenged weanling pigs fed chemically defined diets. **Nebraska Swine Reports**, p. 34–37, 2003.

KITT, S. J.; MILLER, P. S.; FISCHER, R. L. Effects of sow dietary glutamine supplementation on sow dietary glutamine supplementation on sow and litter performance subsequent weanling pig performance and intestinal development after an immune challenge. **Nebraska Swine Report**, p. 14-17, 2004.

LEE, D. N.; CHENG, Y. H.; WU, F. Y.; SATO, H.; SHINZATO, I.; CHEN, S.P.; YEN, H. Effect of dietary glutamine supplement on performance and intestinal morphology of weaned pigs. **Journal Animal Science**, p. 1770–1776, 2003.

LOBLEY, G.; HOSKIN, S.; MCNEIL, C. Glutamine in animal science and production. **The Journal of Nutrition**, p. 2525–2531, 2001.

MANSO, H. E. C. C. **Avaliação da glutamina sintetase e da concentração da glutamina no terço final da gestação e na lactação de camundongos fêmeas e matrizes suínas**. 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C.; DE CARVALHO, L. E.; KUTSCHENKO, M.; NOGUEIRA, E. T.; WATFORD, M. Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 2, 2012.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PHITON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153–63, 2003.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. R. **Glutamina, ácido glutâmico e ou extrato de levedura na dieta de leitões desmamados**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, n. 1-3, p. 215–236, 1997.

SAS STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS: Software**. Versão 9.2. Cary: SAS Institute, 2002-2008.

SOUBA W. W.; HERSKOWITZ K.; SALLOUM R. M.; CHEN M. K.; AUSTGEN T. R. Gut glutamine metabolism. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n. 4 (suppl.), p. 45S -50S, 1990.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249–1252, 1998.

WU, G. Recent advances in swine amino acid nutrition. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 1, p. 49–61, 2010b.

WU, G.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A. ; KIM, S. W. ; LI, X. L.; SATTERFIELD, M. C. ; SPENCER, T. E. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. E195–E204, 2010.

WU, G.; BAZER, F. W.; JOHNSON, G. A; KNABE, D. A.; BURGHARDT, R. C.; SPENCER, T. E.; LI, X. L.; WANG, J. J. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 7, p. 2017–30, 2011.

WU, G.; KNABE, D. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. **Journal of Nutrition**, v.124, p. 415-424, 1994.

WU, G.; MEIER, S. A.; KNABE, D. A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2578–2584, 1996.

YI, G. F; ALLEE, G. L. **Revisão de literatura: glutamina (Gln) e glutamato (Glu)**, 2004. Disponível em:
http://www.lisina.com/upload/Revis%C3%A3o_Glutamina_Glutamato_port.pdf. Acesso em: 06 de julho de 2014.

ZOU, X. T.; ZHENG, G. H.; FANG, X. J.; JIANG, J. F. Effects of glutamine on growth performance of weanling piglets. **Czech Journal Science**, v. 51, n. 10, p. 444-448, 2006.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo com a suplementação de L-glutamina e L-ácido glutâmico durante a aplicação do flushing (capítulo I) sugerem influência no aumento na taxa de ovulação e efeito positivo na viabilidade embrionária. No segundo capítulo, a suplementação a partir de 75 dias de gestação e lactação, revelou melhoras na sobrevivência de leitões na maternidade, que incluem os leitões com peso inferior a 1,100 kg. A suplementação nos terços inicial e médio da gestação, influenciou no maior peso dos fetos aos 73 dias de gestação, aliado a melhor homogeneidade de desenvolvimento do número de fetos.

Os leitões que receberam a suplementação após o desmame (capítulo III), apresentaram uma conversão alimentar melhor no período crítico de desenvolvimento dos leitões, particularmente dos 21 a 34 dias de idade no grupo suplementado, em relação aos animais controles, os quais desmamaram mais pesados. Mesmo com a diferença inicial, os leitões chegaram até o período de terminação com pesos equivalentes ($p>0,05$).

A suplementação no flushing e terços inicial e médio da gestação trazem novas perspectivas para o uso da suplementação com L-glutamina e L-ácido glutâmico para matrizes de alto potencial genético.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BAZER, F. W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; WU, G. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v. 138, p.195–209, 2009.

BRUMANO, G. Fatores que influenciam as exigências de metionina mais cistina para aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 6, p. 749-761, 2008.

CABRERA, R. A; USRY, J. L.; ARRELLANO, C.; NOGUEIRA, E.; KUTSCHENKO, M.; MOESER, A. J.; ODLE, J. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2013.

CARBONE, A. **Emprego de gonadotrofinas exógenas na indução e sincronização da puberdade em marrãs**. 2002. Dissertação (Mestre em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002

CARPINELLI, A. R.; XIMENES, H. M. A. Importância da glutamina no processo de secreção da insulina. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap 8, 149-154.

CARVALHO, L. E.; MANSO, H. E. C. C. C.; NEPOMUCENO, R. C.; AQUINO, T. M. F.; RIBEIRO, J.C. Suplementação com glutamina em porcas primíparas no terço final da gestação e período de lactação sobre a prolificidade no parto seguinte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL,1., 2008, Fortaleza. **Anais...** 2008.

CEDDIA, R. B.; GARCIA JÚNIOR, J. R.; CURI, R. In: Metabolismo da glutamina no músculo esquelético. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap. 9, p. 155-161.

CIA, M. C; EDWARDS, S. A.; GLASGOW, V. L.; SHANKS, M.; FRASER, H. Modification of body composition by altering the dietary lysine to energy ratio during rearing and the effect on reproductive performance of gilts. **Journal of Animal Science**, v.66, p. 457-463, 1999.

CLOWES, E. Skeletal muscle protein mobilization during the progression of lactation. **American Journal of Animal Science**, n. 204, p. 564–572, 2005.

COTA, T. S.; DONZELE, J. L.; OLIVEIRA, R. F. M.; LOPES, D. C.; ORLANDO, U. A. D.; GENEROSO, R. A. R. Níveis de lisina em ração de lactação para fêmeas suínas primíparas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 115-122, 2003.

CLOWES, E. J.; AHERNE, F. X.; FOXCROFT, G. R.; BARACOS, V. E. Selective protein loss in lactating sows is associated with reduced litter growth and ovarian function. **Journal of Animal Science**, v.81, p. 753-764, 2003.

CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPÉGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 392-397, 2009.

CURI, R. Considerações preliminares. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap. 1, 15-16.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; CORLESS, M. NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, p. 392-401, 2005.

CURTHOYS, N. P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine. **Annual Reviews Nutrition**, v. 15, p. 133-59, 1995.

DARMAUN, D.; HUMBERT, B. Does the fate of enterally administered glutamine depend on its molecular form? bound versus free amino acid. **Nutrition**, v. 16, p. 1101-1102, 2000.

DOEPEL, L.; LESSARD, M.; GAGNON, N.; LOBLEY, G. E.; BERNIER, J. F.; DUBREWIL, P.; LAPIERRE, H. Effect of postprandial glutamine supplementation on immune response and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3107-3121, 2006.

ECKHARDT, O. H. O. **Estudo de desempenho reprodutivo e perfil metabólico de fêmeas suínas primíparas submetidas a manejos nutricionais diferenciados aliados ao emprego de gonadotrofinas exógenas**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ECKHARDT, O. H. O.; HORTA, F. C.; PARAZZI, L. J.; AFONSO, E. R.; MARTINS, S. M. M. K.; SANTO, T. A.; BARROS, F. R.; FREITAS, J. E.; RENNÓ, F. P.; VISINTIN, J. S.; MORETTI, A. S. Differences in maternal plane of nutrition and body condition during late gestation coupled with estrus synchronization at weaning do not result in differences in embryonic development at 4 days of gestation. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3436-3444, 2013.

FAHMY, M. H.; HOLTSMANN, W. B.; BAKER, R. D. Failure to recycle after weaning, and weaning to estrus interval in crossbred sows. **Animal Production**, v. 29, p. 193-202, 1979.

FIALHO, E. T.; RODRIGUES, P. B.; AMARAL, N. O.; ZANGERÔNIMO, M. G.; CANTARELLI, V. S. Redução da poluição ambiental por dejetos de suínos utilizando os instrumentos da nutrição. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1., 2008. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2008.

FLOWERS, B.; MARTIN, M. J.; CANTLEY, T. C.; DAY, B. N. Endocrine changes associated with a dietary-induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts. **Journal Animal Science**, v. 67, p. 771-778, 1989.

FORD, S. P.; VONNAHME, K. A.; WILSON, M. E. Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. E66-E73, 2002.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; BERMAN, J. M. Dexamethasone administration induces increased glutamine specific activity in the jejunum and colon. **The Journal of Surgical Research**, v. 44, p. 391-396, 1988.

FRANCISCO, T. D.; PITHON-CURI, T. C.; CURTI, R.; GARCIA JÚNIOR, J. R. Glutamina: metabolismo, destinos, funções e relação com o exercício físico. **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**, v. 6, n. 1, p. 81-88, 2002.

GAMA, R. D. **Emprego de diferentes doses de LH suíno na indução e sincronização da puberdade em marrãs**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestre em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GAMA, R. D.; VIANNA, W. L.; MORETTI, A. S.; CARBONE, A.; PORTELLA, G.; CANDINI, P. H.; VIANA, C. H. C.; PINESE, M. E.; ROSSETO, A. C.; LAGO, V. Avaliação da utilização do LH porcino (lutropin®) para indução e sincronização da puberdade em fêmeas suínas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 1., 2002, Foz do Iguaçu. **Anais...** 2002. p. 149-150.

GAUGHAN, J. B.; CAMERON, R. D. A.; McL. DRYDEN, G. YOUNG, B. A. Effect of body composition at selection on reproductive development in large white gilts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1764:1772, 1997.

GEISERT, R. D.; SCHMITT, R. A. M. Early embryonic survival in the pig: can it be improved. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. E54-E65, 2002.

HANCZAKOWSKA, E.; NIWIŃSKA, B. Glutamine as a feed supplement for piglets: a review. **Annual Animal Science**, v. 13, n. 1, p. 5–15, 2013.

JI, F.; WU, J. R.; BLANTON, J. R.; KIM, S. W. Changes in weight and composition in various tissues of pregnant gilts and their nutritional implications. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 366-375, 2005.

JINDAL, R.; COSGROVE, J. R.; FOXCROFT, G. R. Progesterone mediates nutritionally induced effects on embryonic survival in gilts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1063-1070, 1997.

KENNEDY, G. C.; MITRA, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. **Journal of Physiology**, v. 166, p. 408-418, 1963.

KIM, S. W.; HURLEY, W. L.; WU, G.; JI, F. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 123–132, 2009.

KIRKWOOD, R. N.; AHERNE, F. X. Energy intake, body composition and reproductive performance of the gilt. **Journal of Animal Science**, v.60, p.1518-1529, 1985.

KITT, S. J.; MILLER, P. S.; FISCHER, R. L. Effects of sow dietary glutamine supplementation on sow dietary glutamine supplementation on sow and litter performance subsequent weaning pig performance and intestinal development after an immune challenge. **Nebraska Swine Report**, p. 14-17, 2004.

KUSINA, J.; PETTIGREW, J. E.; SOWER, A. F.; WHITE, M. E.; CROOKER, B. A.; HATHAWAY, M. R. Effect of protein intake during gestation and lactation on the lactational performance of primiparous sows. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 931-941, 1999.

LAGO, V. **Estudo dos efeitos combinados de gonadotrofinas e flushing em marrãs à puberdade**. 2003, 87 f. Dissertação (Mestre em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LI, X.; BAZER, F. W.; GAO, H.; JOBGEN, W.; JOHNSON, G. A.; LI, P.; MCKNIGHT, J. R.; SATTERFIELD, M. C.; SPENCER, T. E.; WU, G. Amino acids and gaseous signaling. **Amino Acids**, v. 37, p. 65–78, 2009.

LOBLEY, G.; HOSKIN, S.; MCNEIL, C. Glutamine in animal science and production. **The Journal of Nutrition**, p. 2525–2531, 2001.

-
- MANSO, H. E. C. C. C.; MANSO FILHO, H. C.; DE CARVALHO, L. E.; KUTSCHENKO, M.; NOGUEIRA, E. T.; WATFORD, M. Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 2, 2012.
- MANSO, H. E. C. C. C. **Avaliação da glutamina sintetase e da concentração da glutamina no terço final da gestação e na lactação de camundongos fêmeas e matrizes suínas**. 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- MANSO FILHO, H. C.; MCKEEVER, K. H.; GORDON, M. E.; MANSO, H. E. C. C. C.; LAGAKOS, W. S.; WATFORD, M. Changes in glutamine metabolism indicate a mild catabolic state in the transition mare. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3424-3431, 2008.
- NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PHITON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153-63, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Swine**. 10. ed. Washington D.C.: National Academy Press, p. 36-40, 1998.
- OELKE, C. A.; DAHLKE, F.; BELTRANI, O. C.; POZZA, P. C.; PAZUCH, D.; MEURER, R. F. P. Níveis de lisina digestível em dietas de fêmeas suínas primíparas em lactação. **Acta Science Animal Science**, v. 30, n. 30, p. 299-306, 2008.
- PALANCH, A. C. Metabolismo da glutamina no intestino. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap 4, p. 85-96.
- PATTERSON, J. L. **Factors influencing onset of puberty in gilts**. 2001.140p. Thesis (Master of Science) - University of Alberta, Alberta, 2001.
- PINESE, M. E. **Puberdade em marrãs: I – Efeito das gonadotrofinas na indução e sincronização do estro à puberdade. II – Efeito do “Flushing” alimentar no ciclo anterior à primeira concepção. III – Avaliação da eficiência produtiva e reprodutiva das marrãs até primeiro parto**. 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- RHOADS, J. M.; WU, G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino Acids**, v. 37, p. 111-122, 2009.
-

SCHENKEL, A. A.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZOO, F. P.; WENTZ, I. Body reserve mobilization during lactating in first parity sows and its effect on second litter size. **Livestock Science**, v. 132, p. 165-172, 2010.

SANTIAGO, C. **Glutamina, ácido glutâmico e valina em rações para leitões desmamados aos 21 dias de idade**. 2008, 55 f. Dissertação (Mestrado em *Magister Scientiae*). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

SILVA, B. A. N. Nutrição de fêmeas suínas de alta performance reprodutiva nos trópicos. **Revista Suínos & Cia**, v. 37, p.10-35, 2010.

SILVA, C. C. **Efeito das fontes de zinco na dieta de matrizes suínas e na sua progênie**. 2014. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

SILVA, L. C. R. **L-glutamina e L-glutamato em dietas para tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008, 50 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

SELF, J. T.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; HU, J.; BAZER, F. W.; WU, G. Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1444–51, 2004.

SOUBA, W. W.; HERSKOWITZ, K.; SALLOUM, R. M.; CHEN, M. K.; AUSTGEN, T. R. Gut glutamine metabolism. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n. 4 (suppl.), p. 45S -50S, 1990.

TOWN, S. C., PATTERSON, J. L.; PEREIRA, C. Z.; GOURLEY, G.; FOXCROFT, G. R. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 301–316, 2005.

VESSEUR, P. C. **Causes and consequences of variation in weaning to oestrus interval in the sow**. Dissertation (PhD in Animal Science) - Research Institute for Pig Husbandry. Landbouw Universiteit Wageningen, Wageningen, 1997.

WHITTEMORE, C. T. Nutrition reproduction interactions in primiparous sows. **Livestock Production Science**, v. 46, p. 65-83, 1996.

WU, G.; MEIER, S. A.; KNABE, D. A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2578–2584, 1996.

WU, G.; POND, W. G.; OTT, T.; BAZER, F. W. Maternal dietary protein deficiency decreases amino acid concentrations in fetal plasma and allantoic fluid of pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 5, p. 894–902, 1998.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249–1252, 1998.

WU, G.; BAZER, F. W.; WALLACE, J. M.; SPENCER, T. E. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2316–2337, 2006.

WU, G. **Nutrição da glutamine em suínos: da pesquisa básica à suinocultura**. 2005. Disponível em: www.lisina.com.br. Acesso em: 04 de Maio. 2010.

WU, G.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A. ; KIM, S. W. ; LI, X. L.; SATTERFIELD, M. C. ; SPENCER, T. E. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. E195–E204, 2010a.

WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction and health. **Advances Nutrition**, v. 1, p. 31–37, 2010c.

WU, G.; BAZER, F. W.; JOHNSON, G. A.; KNABE, D. A.; BURGHARDT, R. C.; SPENCER, T. E.; LI, X. L.; WANG, J. J. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 7, p. 2017–30, 2011.

YI, G. F.; ALLEE, G. L. **Revisão de literatura: glutamina (Gln) e glutamato (Glu)**, 2004. Disponível em: http://www.lisina.com/upload/Revis%C3%A3o_Glutamina_Glutamato_port.pdf. Acesso em: 06 de julho de 2014.

YANG, Y. X.; HEO, S.; JIN, Z.; YUN, J. H.; CHOI, J. Y.; YOON, S. Y.; PARK, M. S.; YANG, B. K.; CHAE, B. J. Effects of lysine intake during late gestation and lactation on blood metabolites, hormones, milk composition and reproductive performance in primiparous and multiparous sows. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 199–214, 2008.

YOO, S. S.; CATHERINE, J.; FIELD, J.; McBURNEY, M. I. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 2253-2259, 1997.

VERSTEGEN, M. W. A.; MOUGHAN, P. J.; SCHRAMA, J. W. **The lactating sow**. Holanda: Amsterdam Wageningen Pers, 1998.

VIANNA, W.; PINESE, M. E.; ROSSETO, A. C.; MORETTI, A. S. Indução da puberdade do cio subsequente em fêmeas suínas pré-puberres utilizando gonadotrofinas exógenas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialista em Suínos, 2003. p. 163–164.

ZAVARIZE, K. C.; MENTEN, J. F. M.; TRALDI, A. B.; SANTAROSA, J.; SILVA, C. L. S. Administration of glutamine in the nutrition of monogastric animals. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, p. 5–10, 2010.

ZOU, X. T.; ZHENG, G. H.; FANG, X. J.; JIANG, J. F. Effects of glutamine on growth performance of weanling piglets. **Czech Journal Science**, v. 51, n. 10, p. 444-448, 2006.