



**MARILANE DAS DORES SILVA**

**ARGININA E VALINA NA NUTRIÇÃO DE MATRIZES  
SUÍNAS HIPERPROLÍFICAS**

**LAVRAS-MG  
2018**

**MARILANE DAS DÔRES SILVA**

**ARGININA E VALINA NA NUTRIÇÃO DE MATRIZES SUÍNAS  
HIPERPROLÍFICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

**PROF. DR. MÁRVIO LOBÃO TEIXEIRA DE ABREU**  
**ORIENTADOR**

**LAVRAS- MG**  
**2018**

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

SILVA, MARILANE DAS DORES.

ARGININA E VALINA NA NUTRIÇÃO DE MATRIZES  
SUÍNAS HIPERPROLÍFICAS / MARILANE DAS DORES  
SILVA. - 2018.

76 p.: il.

Orientador (a): MÁRVIO LOBÃO TEIXEIRA DE ABREU.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. NUTRIÇÃO MATRIZES SUÍNAS. 2. AMINOÁCIDOS  
FUNCIONAIS. 3. GLÂNDULA MAMÁRIA. I. ABREU,  
MÁRVIO LOBÃO TEIXEIRA DE. . II. Título.

**MARILANE DAS DORES SILVA**

**ARGININA E VALINA NA NUTRIÇÃO DE MATRIZES SUÍNAS  
HIPERPROLÍFICAS**

**ARGININE AND VALINE IN THE NUTRITION OF HYPERPROLIFIC SOWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA EM 08, DE MAIO DE 2018.

DR. ALEXANDRE DE OLIVEIRA TEIXEIRA - UFSJ

DR. MÁRCIO GILBERTO ZANGERÔNIMO - UFLA

DR. RAIMUNDO VICENTE DE SOUSA - UFLA

DR. RONY ANTÔNIO FERREIRA - UFLA

PROF. DR. MÁRVIO LOBÃO TEIXEIRA DE ABREU

ORIENTADOR

**LAVRAS- MG  
2018**

*À minha bisavó Laura, por me mostrar através do sofrimento da escravidão à luz que sempre me guiou em busca da maior expressão de liberdade: o conhecimento.*

*Aos meus pais, Marcos e Maria, por sempre me apoiar e me ensinar o verdadeiro significado da sabedoria, o temor a DEUS.*

*Aos meus filhos, Maria Teresa e João Marcos, jamais permitam que as dificuldades da vida limitem seus sonhos, façam delas um trampolim para o sucesso.*

*A todas as mulheres negras que deixaram as vassouras e avançaram copa à dentro, não desistam.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o EU SOU em minha vida, por ter sempre me diminuído enquanto a Tua presença se engrandecia em mim, minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Marcos Antônio da Silva e Maria Aparecida de Fátima Silva, pelos ensinamentos e valores, pelo amor e dedicação sem limite, por ser a fortaleza da minha vida.

Às minhas irmãs, Márcia e Mônica, pelo amor, pelo apoio, paciência e companheirismo.

Aos meus filhos, Maria Teresa e João Marcos, por ser a expressão mais pura do amor e dar vida a nossa família.

Ao meu amigo de longa jornada, Marco Túlio, por esses anos de convivência e amor.

À minha família, pelas orações, pelo apoio e pelos momentos de companheirismo.

À minha avó Anézia e ao meu Tio Gilberto, que sempre acreditaram nos meus sonhos, sei que um dia ainda iremos nos reencontrar.

À República das “Lias”, minhas amigas, Anaíse, Mirinha, Raquel, Marseile e Mariana por me acolherem de coração aberto, pelos ensinamentos, companheirismo nos momentos de alegrias e dificuldades.

A todas minhas amigas por cada palavra de amparo e força.

As enfermeiras da Santa Casa de Belo Horizonte e do Hospital São Sebastião de Santo Antônio do Amparo, por terem sempre uma palavra de força e apoio, fundamentais para que eu não desistisse em meio a tanta dor e sofrimento.

Ao Prof. Dalton Fontes, Isabela Sabino, Bruno Oliver e Renan Paulino por compartilharem comigo seus conhecimentos e contribuírem na elaboração desse projeto.

Ao meu orientador Professor Márvio Lobão Teixeira de Abreu, pela confiança e ensinamentos.

Ao Professor da UFV, Alysson Saraiva e sua equipe, por fazer parte da execução desse projeto.

À Professora da UFV, Simone E. Falcioni e ao Laboratório de Biologia Molecular, em especial o técnico Walmir, muito obrigada pela contribuição de vocês, foram fundamentais.

À Fazenda São Paulo por fazer parte do desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos Prof (e)s. Fladimir Wouters e José Rafael Miranda pela ajuda nas análises de histologia;

Ao Prof. Márcio Zangerônimo e suas orientadas, Pâmela e Danusa, pela disponibilidade e paciência na execução da análise de imunohistoquímica.

A Pós-doutoranda Tathyane, pela paciência e auxílio nas análises de expressão gênica.

Aos meus colegas do NESUI por longos anos de contribuição a minha formação acadêmica, pelas confraternizações e amizades.

A equipe do grupo de Nutrição de fêmeas suínas, sem vocês seria impossível à realização desse projeto.

Aos meus amigos Cesar A. P. Garbossa, Rennan Herculano Rufino Moreira e Jorge Yair Perez, pela ajuda na condução e idealização desse projeto, muito obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar.

A todos os professores que contribuíram com seus conhecimentos me tornando uma profissional e um ser humano melhor a cada dia.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado

A Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e INCT/CNPQ pelo financiamento desse projeto.

Aos animais, que foram imprescindíveis para execução dessa pesquisa.

**Muito obrigada, sou imensamente grata a cada um de vocês!**

## RESUMO

Os avanços genéticos na suinocultura trouxeram ao mercado matrizes suínas altamente produtivas com grande número de leitões nascidos por leitegada, no entanto, alguns pontos inerentes a esses avanços têm sido preocupantes, devido ao seu impacto econômico na produção suinícola, pois estão diretamente relacionadas com o peso ao nascer, como a desuniformidade das leitegadas com alta variabilidade de peso. Como estratégia para solucionar esses pontos objetivou-se nesse estudo avaliar se a suplementação com Arginina (L-Arg) e Valina (L-Val) na dieta de fêmeas suínas no terço final da gestação e durante a lactação possui efeitos sobre o desenvolvimento da glândula mamária e desempenho das matrizes suínas e suas respectivas leitegadas. Foram conduzidos dois experimentos. No 1º experimento foram analisadas as expressões gênicas de transportadores de aminoácidos (AA) SLC7a7 e SLC7A9; transportadores de ácidos graxos SLC27a1, SLC27a2 e SLC27a4 e proteínas do leite  $\beta$ -caseína (CSN2) e LALBA ( $\alpha$ -lactalbumina). As matrizes foram alimentadas com 1) dieta sem suplementação de AA (CON); 2) CON+L-Arg; 3) CON+ L-Val; 4) CON+L-Arg+ L-Val. A densidade, área e diâmetro alveolar não foram influenciados pela suplementação com L-Arg e L-Val, no entanto, a combinação de L-Arg+ L-Val aumentou a proliferação celular na glândula mamaria de porcas durante a lactação. A suplementação com os AA não influenciou na expressão dos genes BCATm, SLC27a2, CSN2 e LALBA. A expressão gênica da BCATc foi maior no tratamento com L-Arg quando comparado as matrizes do tratamento com L-Val e L-Arg+L-Val. O gene SLC7a7 foi menos expresso no tratamento com L-Val quando comparado ao tratamento CON e L-Arg. O gene SLC7a9, teve foi menos expresso no tratamento com L-Arg+L-Val do que nos tratamentos CON e com L-Arg. A expressão do gene SLC27a1 foi semelhante entre os tratamentos, exceto no tratamento com L-Val. A expressão do gene SLC27a4 foi semelhante ao controle nos tratamentos com L-Arg e L-Val, e menor no tratamento LArg+L-Val. No 2º experimento foram adotados os mesmos tratamentos, no entanto o período de suplementação foi distinto, sendo as matrizes suplementadas a partir dos 85 dias de gestação e durante toda a lactação (21 dias). Foram avaliados os parâmetros de desempenho da leitegada, condição corporal das matrizes, consumo médio de ração e parâmetros sanguíneos. A suplementação com L-Arg e L-Val não teve efeito sobre os parâmetros reprodutivos, produtivos e sanguíneos das fêmeas suínas no terço final de gestação e lactação, exceto para o número total de leitões nascidos, cujos tratamentos CON e L-Val diferiram, mas estes foram semelhantes entre os demais tratamentos. Conclui-se que a suplementação com 1% L-Arg, e 120% de L-Val:Lis em rações contendo milho, farelo de soja a partir do 85º dia de gestação e durante a lactação não promoveu melhora na condição corporal das fêmeas suínas hiperprolíficas e no desempenho das respectivas leitegadas, assim como sobre a expressão de genes relacionados a síntese de proteínas e gorduras no leite, no entanto aumentou à proliferação celular na glândula mamária de matrizes suínas durante a lactação.

**Palavras-chave:** aminoácidos funcionais, expressão gênica, histologia, imunohistoquímica, leitões, nutrição materno-fetal

## ABSTRACT

Genetic advances in swine farming have brought to the market highly productive sows with large numbers of piglets born to litter, however, some points inherent to these advances have been worrisome due to their economic impact on pig production, since they are directly related to weight at birth, as the disuniformity of litters with high weight variability. As a strategy to solve these points, the objective of this study was to evaluate whether supplementation with Arginine (L-Arg) and Valine (L-Val) in the diet of sows in the final third of gestation and during lactation has effects on the development of the gland mammary and performance of swine matrices and their respective litters. Two experiments were conducted. In the first experiment the gene expression of amino acid transporters (AA) SLC7a7 and SLC7A9; SLC27a1, SLC27a2 and SLC27a4 fatty acids, and  $\beta$ -casein (CSN2) and LALBA ( $\alpha$ -lactalbumin) milk proteins. The matrices were fed with 1) diet without supplementation of AA (CON); 2) CON + L-Arg; 3) CON + L-Val; 4) CON + L-Arg + L-Val. The density, area and alveolar diameter were not influenced by supplementation with L-Arg and L-Val, however, the combination of L-Arg + L-Val increased the cell proliferation in the mammary gland of sows during lactation. Supplementation with AA did not influence expression of BCATm, SLC27a2, CSN2 and LALBA genes. Gene expression of BCATc was higher in L-Arg treatment when compared to L-Val and L-Arg + L-Val treatment matrices. The SLC7a7 gene was less expressed in the treatment with L-Val when compared to the treatment CON and L-Arg. The SLC7a9 gene was less expressed in the L-Arg + L-Val treatment than in the CON and L-Arg treatments. Expression of the SLC27a1 gene was similar between treatments, except for treatment with L-Val. SLC27a4 gene expression was similar to control in L-Arg and L-Val treatments, and lower in L-Arg + L-Val treatment. In the second experiment, the same treatments were adopted, however the supplementation period was different, and the matrices were supplemented from the 85 days of gestation and throughout the lactation (21 days). The performance parameters of the litter, body condition of the sows, average feed intake and blood parameters were evaluated. Supplementation with L-Arg and L-Val had no effect on the reproductive, productive and blood parameters of the sows in the final third of gestation and lactation, except for the total number of piglets born, whose treatments CON and L-Val differed, but these were similar among the other treatments. It was concluded that supplementation with 1% L-Arg and 120% of L-Val: Lys in rations containing corn, soybean meal from the 85th day of gestation and during lactation did not promote improvement in the body condition of the sows as well as on the expression of genes related to the synthesis of proteins and fats in the milk, but increased to the cellular proliferation in the mammary gland of sows during lactation.

**Keywords:** functional amino acids, gene expression, histology, immunohistochemistry, piglets, maternal-fetal nutrition

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>10</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>II. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
<b>III. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....</b>	<b>37</b>
<b>ARTIGO 1- EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA E L-VALINA NA RAÇÃO DE LACTAÇÃO SOBRE A GLANDULA MAMÁRIA DE MATRIZES SUÍNAS HIPERPROLÍFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>IV. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>V. CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>ARTIGO 2- DESEMPENHO DE MATRIZES SUÍNAS HIPERPROLÍFICAS SUPLEMENTADAS COM L-ARGININA E L-VALINA NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>V. CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>76</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **I. INTRODUÇÃO**

Os avanços na seleção genética na suinocultura têm resultado em fêmeas com alto potencial reprodutivo, sendo cada vez mais frequente o número de matrizes que apresentam taxa de ovulação elevada e grande número de leitões nascidos por leitegada, sendo conhecidas como fêmeas hiperprolíficas. A hiperprolificidade trouxe consigo a necessidade de adequação dos programas nutricionais ao potencial genético e nível de produção dessas matrizes disponíveis no mercado.

Atualmente, as matrizes suínas apresentam-se mais precoces, mais produtivas, com maior peso corporal e maior exigência nutricional. No entanto, esses avanços genéticos não ocorreram na mesma intensidade sobre os aspectos fisiológicos, como capacidade uterina, eficiência placentária e nutrição materno-fetal.

Dessa forma a vantagem de se produzir leitegadas numerosas está associada à produção de leitões com baixo peso ao nascer e alta variabilidade dentro das leitegadas, visto que esses leitões competem com menos sucesso pelo alimento, especialmente durante a lactação, com isso apresentam menores taxas de crescimento e, conseqüentemente, menor peso ao desmame.

Um ajuste nutricional na nutrição da matriz gestante pode minimizar esses problemas quando se leva em consideração o fornecimento de nutrientes em quantidades adequadas para a formação e desenvolvimento dos embriões/fetos, placenta e anexos placentários.

O sucesso de um sistema de produção de suínos está relacionado ao bom desempenho de suas matrizes e a adequação de programas nutricionais nas diversas fases da vida da matriz, com isso vários estudos enfatizam a utilização de aminoácidos funcionais no período gestacional e lactacional, fases de alta demanda de nutrientes para o desenvolvimento fetal e produção de leite, no intuito de melhorar a qualidade e obter um número maior de leitões viáveis.

Na lactação a alta demanda nutricional para a produção de leite aliada ao limitado consumo alimentar determina a utilização de uma dieta que atenda as exigências nutricionais a fim de evitar perdas corporais e diversos problemas

reprodutivos, além de garantir produção suficiente de leite para a sobrevivência e crescimento da leitegada (JONES; STAHLY, 1999).

Dessa forma a suplementação com aminoácidos funcionais veem sendo utilizada como alternativa para melhorar a condição corporal das matrizes suínas, o desempenho da leitegada e a produção tanto de leite quanto de colostro. A suplementação com L-Arginina durante a gestação já se mostrou benéfica para o desempenho dos leitões ao nascimento, além de participar da regulação da angiogênese, vascularização, funções da artéria umbilical e placenta, favorecendo a captação de mais nutrientes e oxigênio da porca para os fetos e, conseqüentemente, melhorar o seu desenvolvimento. Na lactação, já foi visto que a suplementação com L-Arginina aumenta a produção, o percentual de proteína e gordura do leite, e conseqüente o desempenho da leitegada ao desmame.

A suplementação com L-Valina é outro importante aminoácido na nutrição de fêmeas suínas. A valina é considerada como o terceiro aminoácido limitante para as porcas lactantes após lisina e treonina, devido à mobilização do tecido corporal. Vários estudos já foram conduzidos com L-Valina para fêmeas suínas na lactação onde foram observados que esse aminoácido apresenta a maior taxa de oxidação do qualquer aminoácido na glândula mamária para fornecer energia para a síntese de lactose e ácidos graxos no leite. Além disso, a suplementação com L-Valina melhorou o desempenho da leitegada e minimizou a mobilização corporal nas fêmeas suínas na lactação. Diante disso, objetivou-se desse trabalho foi aliar os benefícios desses aminoácidos e avaliar o efeito da suplementação da ração de gestação e lactação com L-Valina e L-Arginina sobre o desenvolvimento do complexo mamário e desempenho da leitegada até o desmame.

## **II. REFERENCIAL TEÓRICO**

### ***1) Manejo nutricional de matrizes suínas na gestação***

Nos suínos a duração da gestação em suínos dura em média 114 dias, variando em quatro dias, para mais ou menos, de acordo com a genética, linhagem, ambiente e manejo adotado (PANZARDI et al., 2007).

Abreu et al. (2005), afirmam que um programa nutricional para porcas gestantes deve levar em consideração os seguintes aspectos: a) as diferentes fases e fenômenos metabólicos que acontecem na gestação; b) as diferenças de padrão de crescimento entre

as porcas, segundo a ordem de parto; c) o estado metabólico da matriz após a lactação anterior. Todos esses aspectos podem interferir nas exigências nutricionais desses animais e devem ser consideradas para o desenvolvimento de um programa nutricional.

A nutrição da fêmea suína gestante pode ser dividida em fases distintas em relação a eventos e exigências nutricionais. Isso porque durante a gestação, a exigência nutricional é determinada pela demanda para a manutenção e ganho da matriz e desenvolvimento fetal (ABREU et al., 2013; KIM; WU; BAKER, 2005; SILVA, 2010). As linhagens maternas contemporâneas possuem maiores taxas de crescimento fetal, o que leva a um aumento na demanda por nutrientes para suportar as necessidades metabólicas tanto da matriz quanto de seus fetos (WU et al. 2004 ; KIM et al. 2005; LIU et al. 2012). Além disso, essas matrizes tem um maior potencial para crescimento de tecido magro, que está associado com alterações no metabolismo em geral, sendo necessário reavaliar as exigências nutricionais e as técnicas de manejo nutricional, para otimizar o aproveitamento de nutrientes por essas fêmeas (FOXCROFT, 2005).

Dessa forma é proposta a divisão da gestação em três fases: inicial, da cobertura até os 21 dias; intermediária, dos 22 dias aos 75 dias; e fase final, dos 76 dias até o parto.

#### 1.1. Fase inicial ou primeiro terço da gestação

Na fase inicial da gestação os principais eventos gestacionais são a ligação embrio-maternal e início da formação da placenta, até os 21 dias (FOXCROFT; TOWN, 2004). As necessidades nutricionais são ligeiramente superiores às necessidades de manutenção. O manejo nutricional no início da gestação tem como principal finalidade intensificar a sobrevivência de embriões de qualidade e propiciar a formação adequada da placenta e anexos fetais (JINDAL et al., 1996).

#### 1.2. Fase intermediária ou segundo terço da gestação

Nesse período o acompanhamento permanente da condição corporal dos animais é de extrema importância. O principal objetivo de um programa nutricional é garantir o desenvolvimento corporal das fêmeas em crescimento e a recuperação das condições corporais das matrizes, devido à mobilização na lactação anterior. Foxcroft e Town (2004) afirmam que a formação de fibras musculares primárias e secundárias ocorre no período intermediário da gestação. No entanto, estudos realizados por McPherson et al. (2004) e Ji et al. (2005) sugerem trabalhar de forma diferenciada os níveis nutricionais a

partir dos 70 dias de gestação, em função da íntima ligação com o desenvolvimento de fibras musculares dos fetos e formação do complexo mamário, visando o melhor desempenho da leitegada ao nascer e vida reprodutiva futura da fêmea.

### 1.3. Fase final ou terço final de gestação

A terceira fase da gestação é caracterizada pelo maior desenvolvimento da glândula mamária (76 a 90 dias) e pelo crescimento mais acentuado do feto (a partir dos 91 dias). Nesta fase a necessidade de ganho proteico e reserva energética torna-se maior quando comparado aos dois períodos anteriores, resultando em aumento das exigências nutricionais da matriz, pois o crescimento fetal é acelerado no terço final da gestação (McPHERSON et al., 2004; JI et al., 2005) e proteína extra é necessária para este momento, especialmente se ainda estiver ocorrendo crescimento corporal da fêmea jovem.

De acordo com Shields et al. (1985), as fêmeas são muito mais sensíveis à suplementação proteica nesta fase comparando-se com outras fases. A demanda de proteína pode ser suprida através de dietas contendo fontes de ingredientes vegetais ou animais e complementada com a adição de aminoácidos industriais (KIM et al., 2009).

## 2) *Aminoácidos de cadeia ramificada*

A valina (Val) é um aminoácido essencial, pertencente ao grupo dos aminoácidos de cadeia ramificada (branched-chain amino acids; BCAA), assim como a leucina e a isoleucina. Os BCAA são oxidados primariamente no músculo esquelético, diferentemente dos outros aminoácidos que iniciam a oxidação no tecido hepático (LEHNINGER, 2006). No músculo os BCAA servem como um importante substrato de energia em momentos de estresse e exercício tanto como precursores para a síntese de outros aminoácidos e proteínas (FERRANDO et al., 1995; ROGERO; TIRAEGUI, 2008).

Após uma alimentação contendo proteína, os BCAA passam através da circulação hepática para a circulação sistêmica onde então mais de 60% são metabolizados pela musculatura esquelética (GELFAND et al., 1986). A primeira etapa no metabolismo dos BCAA nos tecidos periféricos é a desaminação pela enzima

aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAT) a qual produz cetoácidos de cadeia ramificada.

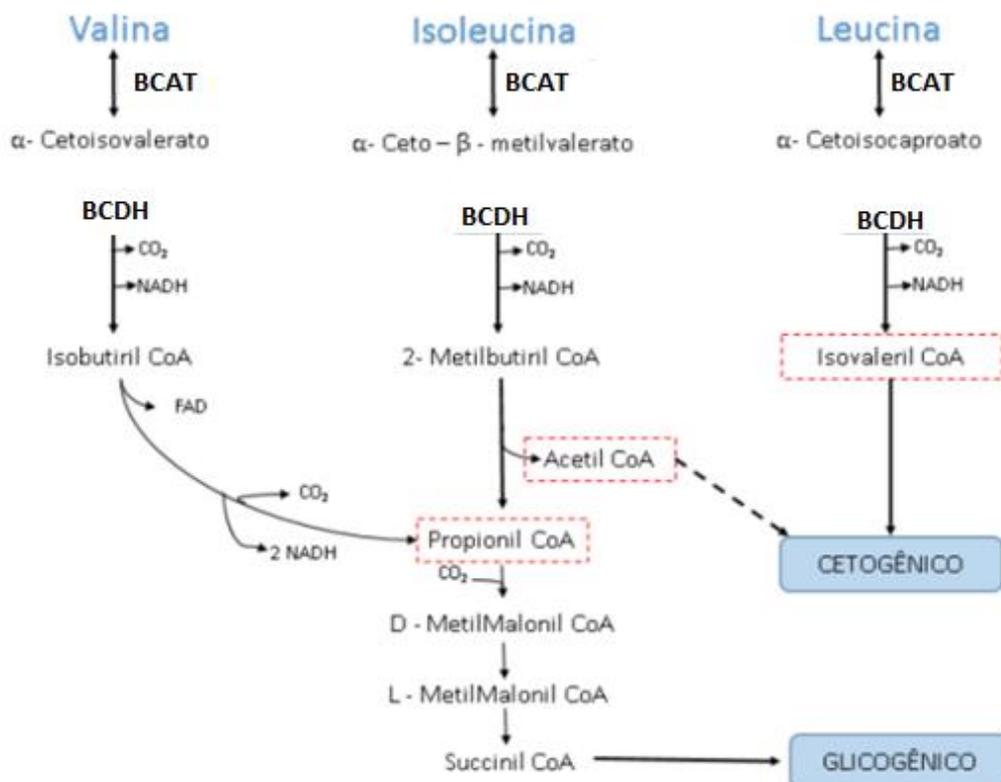
Existem duas isoformas dessa enzima, uma que está presente na mitocôndria (BCATm) e a outra que está no citoplasma (BCATc) (BIXEL et al., 1997). A partir da reação catalisada pela BCAT, os BCAA são convertidos nos seus respectivos cetoácidos, ou seja, a leucina é convertida em  $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC); a isoleucina em  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato (KMV); e a valina em  $\alpha$ -cetoisovalerato (KIV). Concomitantemente, verifica-se que na reação catalisada pela BCAT há a conversão de  $\alpha$ -cetoglutarato – aceptor de nitrogênio oriundo dos BCAA – em glutamato. A partir do glutamato pode ocorrer a síntese de outros aminoácidos, como alanina e glutamina. Desse modo, a transaminação dos BCAA fornece mecanismos para transferir o nitrogênio dos BCAA de acordo com a necessidade do tecido por glutamato e outros aminoácidos não essenciais (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). Além disso, cabe ressaltar que as isoenzimas BCAT em mamíferos são muito específicas para BCAA e glutamato, sendo a preferência de substratos a seguinte: isoleucina, valina e glutamato (CYNOBER; HARRIS, 2006; HARRIS et al., 2005; HUTSON et al., 2005; HARRIS et al., 2004).

Os cetoácidos de cadeia ramificada são então incorporados nas proteínas, ou circulam pelo corpo e servem de substrato energético para musculatura esquelética, cérebro, rins fígado e no coração (ABMURAD et al., 1982; LENINGER, 2006). Os BCAA exercem um efeito importante sobre a homeostase da musculatura esquelética (JURASINSKI et al., 1995). Em 1975, Buse e Reid observaram que a concentração de leucina no músculo desempenha um papel chave na regulação do *turnover* das proteínas musculares. Altas concentrações de leucina foram associadas com supressão da proteólise muscular.

A desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (BCDH) catalisa o segundo e irreversível passo na degradação de BCAA (HARRIS et al., 1997). Esse passo resulta no  $\alpha$ -cetoácido passando pela decarboxilação oxidativa e eventualmente após uma série de reações, resulta na formação de um derivativo da coenzima A. Os produtos dessa reação – derivados de acetil-CoA de cadeia ramificada sofrem oxidação por meio de duas diferentes desidrogenases. Após essa etapa, as vias catabólicas de cada um dos BCAA passam a divergir. A leucina é cetogênica, uma vez que forma acetil-CoA e acetoacetato, enquanto a valina é glicogênica, devido ao fato de ser convertida em succinil-CoA – intermediário do ciclo de Krebs. Tanto a isoleucina quanto a valina

são metabolizadas para succinato via metilmalonil-CoA. O outro produto do metabolismo da isoleucina é o acetoacetato e, desse modo, a isoleucina pode ser considerada como um aminoácido glicogênico e cetogênico (BROSNAN; BROSNAN, 2006; HARPER et al., 1984).

Figura 1 - Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (Adaptado de Brody (1998).



### 2.1. Aminoácidos de cadeia ramificada para fêmeas suínas

Fêmeas suínas em lactação possuem alta exigência de aminoácidos de cadeia ramificada BCAA (WANG et al., 2008), para sustentar a produção de leite (KIM et al., 2009). A captação destes aminoácidos pela glândula mamária (76 g/d do dia 13-20 de lactação) é muito maior do que a sua secreção na proteína do leite (46 g/d) (TROTIER et al., 1997). Portanto, a glândula mamária suína lactante possivelmente cataboliza 30 g BCAA/d que representa cerca de 40% do BCAA retirado do plasma arterial.

A possibilidade de que os BCAA são degradados pela glândula mamária lactante é suportado pelo fato de que a BCAT e a BCDH estarem presentes no tecido

mamário de ratas, com a BCAT sendo induzida aproximadamente 10 vezes mais durante a lactação (De SANTIAGO et al., 1998). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito dos BCAA na glândula mamária durante o processo de lactação.

A ausência da pirrolina-5-carboxilato desidrogenase e da prolina oxidase (O'QUINN et al., 2002), no tecido mamário suíno lactante inviabiliza a conversão de arginina, ornitina ou prolina em glutamina. Assim, o nitrogênio de BCAA deve ser utilizado para a síntese de glutamina na glândula mamária através das reações sequenciais da BCAT e glutamina sintetase como anteriormente reportado para a musculatura esquelética (GOLDBERG; CHANG, 1978; WU et al., 1989; ROGERO; TIRAEGUI, 2008) e placenta (SELF et al., 2004).

O leite da porca contém altas concentrações de glutamina livre ou ligada a peptídeos mais glutamato (WU et al., 1994; REEDS et al., 2000), os quais são cruciais para o crescimento, desenvolvimento e função do intestino delgado dos leitões (REEDS et al., 2000; WANG et al., 2008; KIM; WU, 2009).

A glândula mamária de porcas lactantes introduz 125% mais glutamina no leite do que retira da circulação arterial (TROTIER et al., 1997; HAYNES et al., 2009). É improvável que a glutamina extra, seja derivada da prolina, pois o tecido mamário suíno não possui a enzima prolina oxidase, enzima necessária para esse processo (O'QUINN et al., 2002). Li et al. 2009, verificaram um aumento da síntese de glutamina quando os BCAA foram fornecidos ao tecido mamário suíno, sugerindo uma síntese *de novo* a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato e do nitrogênio de BCAA.

A glândula mamária suína lactante possui atividade particularmente elevada de BCAT, o que explica o fato dos BCAA serem transaminados extensivamente neste tecido e promover a síntese de glutamina (LI et al, 2009). Assim, as concentrações de BCAA livres são baixas, mas as concentrações de glutamato livre e glutamina são elevadas no tecido mamário. Existe um padrão distinto de distribuição de atividade da BCAT na glândula mamária, no músculo esquelético, fígado e intestino delgado de porcas em lactação em comparação com a de ratos não lactantes, seres humanos, e macacos (De SANTIAGO et al., 1998; SURYAWAN et al., 1998; TOVAR et al., 2001).

O tecido mamário também possui atividade relativamente elevada de BCDH que oxidativamente descarboxila os cetoácidos para produzir acetil-CoA, que é posteriormente oxidada através do ciclo de Krebs (BROSNAN; BROSNAN, 2006; HARPER; MILLER, 1984). A acetil-CoA derivada de leucina e isoleucina pode ser

utilizada para a síntese de ácidos graxos no tecido mamário, ao passo que a succinil-CoA produzido a partir do catabolismo da isoleucina e valina pode fornecer esqueletos de carbono para a formação de aminoácidos não essenciais, tais como glutamina (SHIMOMURA et al., 2001). Com isso, verifica-se que durante a lactação, a glândula mamária é um local fisiologicamente significativo para o catabolismo de BCAA (MANJARIN et al., 2014)

A atividade da BCAT no intestino delgado de porcas em lactação (LI et al., 2009) é mais baixa do que a de suínos desmamados (CHEN et al., 2007), leitões lactantes alimentados por via entérica (BURRIN et al., 2003), e em seres humanos adultos (SURYAWAN et al., 1998). O que sugere, que a entrada do BCAA dietético e os seus átomos de carbono na circulação portal podem ser maior nas porcas em lactação em comparação a porcas não lactantes, ou seja, durante a lactação, a glândula mamária é um local fisiologicamente significativo para o catabolismo de BCAA

Assim, pode-se supor que, em porcas lactantes, os BCAA circulantes são preferencialmente canalizados para a glândula mamária em vez do músculo esquelético para apoiar a síntese de glutamina e aspartato. Isso também aumenta a possibilidade de que a síntese de glutamina pelo músculo de porcas em lactação pode estar reduzida (CLOWES et al., 2005).

A valina possui a maior taxa de oxidação em relação a qualquer AA na glândula mamária (KIM et al., 2001), seu papel na síntese do leite não é bem compreendido, mas um estudo fatorial  $2 \times 2 \times 2$  em porcas (dois níveis de valina:lisina; 0,80 e 1,20%), isoleucina:lisina (0,68 e 1,08%), e leucina:lisina (1,57 e 1,97%) descobriram que apenas a suplementação de valina tende a aumentar o nitrogênio do leite, mas não isoleucina ou leucina (MOSER et al., 2000).

Richert et al. (1997) relatou que era necessária uma relação Val:Lis de pelo menos 1,15:1 para maximizar a taxa de crescimento da leitegada. Paulicks et al. (2003), relataram um efeito sobre o crescimento do leitão, o rendimento de leite e a condição corporal das porcas aumentando a relação de Val:Lis total de 0,45 para 0,55%, mas nenhum efeito foi registrado ao aumentar ainda mais a proporção de 0,64 para 1,44%.

Da mesma forma, Gaines et al. (2006), concluíram que um valor total de Val acima de 0,86% não impedi a mobilização excessiva de tecidos corporais ou aumento do peso do leitão, no entanto, compromete-se o crescimento da leitegada com 0,73% de Val:Lis. Anteriormente, Carter et al. (2000), evidenciaram que não há benefício de valina dietética elevada para porcas em lactação que amamentam mais de 10 leitões

consumindo uma dieta de milho e farelo de soja contendo 0,90% lisina e 0,80% de valina.

Devi et al. (2015), trabalharam com duas dietas experimentais contendo 0,80 ou 0,85% de Val:Lis, durante a lactação de 24 dias, e ao final, não encontram influência da suplementação de Val sobre perda de peso corporal, consumo médio diário de ração, perda de gordura e retorno ao estro nos níveis 0,80 e 0,85% de valina:lisina. Além disso, não houve diferença sobre o desempenho da leitegada, mas observaram um aumento da concentração de arginina e treonina no leite.

Craig et al. (2016), investigaram as exigências nutricionais de valina para as porcas lactantes hiperprolíficas para melhorar o desempenho dos leitões, trabalharam com dois níveis de Val:Lis (0,68 e 1,10%), e viram que o aumento dos níveis de Val não melhorou o desempenho das matrizes e nem de suas leitegadas.

Strathe et al. (2016), visto à escassez de estudos que investigavam níveis de Val:Lis acima de 0,84:1 para as porcas de alta produção, que desmamam mais de 12 leitões, analisaram diferentes níveis de valina na dieta durante a lactação: 0,84, 0,86, 0,88, 0,90, 0,95 ou 0,99%. E não observaram benefícios sobre a condição corporal das matrizes e desempenho da leitegada ao aumentar a relação Val:Lis acima de 0,84:1.

Xu et al. (2017), alimentaram as porcas com dietas à base de farelo de soja e milho contendo 63, 83, 103 ou 123% Val:Lis a partir do dia 107 da gestação até o dia 28 da lactação. E verificaram que os níveis 88 e 113% de Val:Lis foram ótimos para evitar a perda mínima de gordura das matrizes e a taxa máxima de crescimento de leitões, o que excede os 85% estimado pelo NRC (2012).

### **3) Arginina**

A arginina (Arg) é um aminoácido condicionalmente essencial produzido no organismo, porém em quantidade insuficiente para todas as necessidades (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000), devendo ser fornecida via dieta a fim de atender a necessidade do organismo em condições nas quais a síntese endógena são inferiores à taxa de utilização (WU et al., 2014). Além disso, a arginina é considerada um aminoácido funcional, pois atua veemente sobre a regulação de vias metabólicas que são necessárias para manutenção, crescimento, reprodução e imunidade dos seres vivos (WU, 2009).

Em suínos, a síntese endógena de Arg ocorre nas células renais, nos enterócitos e nos hepatócitos, sendo que em cada um desses sítios existem vias específicas de síntese e transporte dos produtos metabolizados (WU et al., 1997). Nos rins, a reação é mediada por duas enzimas, a argininosuccinato sintetase e a argininosuccinato-liase que atuam sobre a citrulina. Assim, a citrulina é absorvida pelo intestino delgado e transportada através da circulação até os rins, onde será captada e utilizada para a produção de Arg, qualquer deficiência na síntese de citrulina intestinal restringe a síntese de arginina renal. (DHANAKOTI et al., 1990).

A absorção de arginina no intestino ocorre na porção da borda em escova da membrana do enterócito, mediado pelos sistemas específicos de transporte de aminoácidos bipolares, sistema B<sup>0+</sup> (Na<sup>+</sup> independente) e b<sup>0+</sup> (Na<sup>+</sup> dependente). Outro sistema envolvido no transporte de aminoácidos catiônicos é o sistema Y<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup> independentes), cuja absorção ocorre na porção basolateral da membrana (AIRES, 1999). No fígado as concentrações elevadas de arginase, impede que a produção de arginina exceda, pois, essa enzima atua na degradação da arginina produzida no ciclo da ureia (WU; MORRIS, 1998).

A síntese endógena de arginina atende cerca de 50% das necessidades diárias deste aminoácido em suínos jovens, sendo a produção pelo organismo importante na regulação da homeostasia desse aminoácido em neonatos e (FLYNN; WU, 1996), primordial, entre o 3° e 21° dia de idade, momento em que o organismo do leitão é capaz de sintetizar apenas cerca de 60% de suas exigências de arginina. Isso porque nos enterócitos ocorre a síntese líquida de arginina, que resulta do balanço entre a arginina catabolizada na mucosa intestinal e a arginina absorvida (STOLL et al., 1998), sendo que a partir do terceiro dia de vida cessa essa síntese líquida de arginina e ocorre à diminuição da síntese de citrulina, tornando essencial o fornecimento de arginina via dieta. Fêmeas suínas em fase de lactação também podem apresentar um déficit na síntese endógena de arginina, o que pode limitar seu desempenho ou comprometer seu sistema imune (LI et al., 2007).

A Arg desempenha múltiplos papéis no metabolismo animal servindo de substrato para a síntese de proteína, como intermediária no ciclo da ureia e como precursora na síntese de vários compostos metabólicos importantes incluindo a prolina, ornitina, poliaminas e óxido nítrico (WU; MORRIS, 1998; KIM et al., 2007). Além disso, atua na angiogênese, possivelmente por suprimir a produção de angiostatina inibidor da angiogênese (MATSUNAGA et al., 2002).

Nas células de mamíferos, prolina e arginina são substratos potenciais para a síntese de ornitina (WU; MORRIS, 1998). Porém em leitões lactentes, a atividade intestinal da arginase é baixa (WU et al., 1996) e assim, a síntese de ornitina é também reduzida, principalmente em enterócitos de neonatos (WU; KNABE, 1994). A pequena quantidade de ornitina no leite e a pouca absorção intestinal da ornitina presente na circulação arterial contribuem para a menor síntese de poliaminas em leitões lactantes (WU et al., 1998). Todavia, devido à elevação gradual da atividade da arginase e ornitina descarboxilase, a síntese de poliaminas aumenta logo após o desmame. O intestino delgado de mamíferos pós-desmame expressa altos níveis de atividade da arginase e, conseqüentemente, 40% da arginina da dieta passam pelo catabolismo no intestino de adultos (WU; MORRIS, 1998).

A prolina é sintetizada a partir de pirrolina-5-carboxilato, a qual é sintetizada por ação da ornitina aminotransferase sobre a ornitina. Esse aminoácido é o principal produto catabólico da arginina nos enterócitos de leitões pós-desmame (WU et al., 1996). Além disso, a prolina é precursora para a síntese de proteínas e para a formação de hidroxiprolina que é necessária para a síntese de colágeno, para a geração de matriz extracelular, atuando na cicatrização de feridas e remodelação de tecidos. Um aumento na conversão de pirrolina-5-carboxilato em prolina estimula o metabolismo da glicose através do ciclo das pentoses. Isso também resulta num aumento da síntese de purinas e proliferação celular (WU et al., 2000; PHANG, 1985).

As poliaminas atuam na regulação da angiogênese e, são essenciais para a proliferação e diferenciação celular, na regulação da expressão gênica, transdução de sinais e síntese de DNA e proteínas (WU et al., 2004; WU, 2009), além de serem primordiais na maturação e remodelação intestinal e regulação da apoptose (WU; MEININGER, 2000).

Outro importante produto catabólico da arginina é o óxido nítrico, formado a partir da ação da enzima óxido nítrico sintetase e apesar de produzido em pequenas proporções, exerce papel crucial em quase todas as células e funções orgânicas no organismo (ALDERTON et al., 2001; WU, MEININGER, 2002). O óxido nítrico liberado ativa a guanilato-ciclase, aumentando o GMP cíclico, promovendo relaxamento da musculatura lisa (IGNARRO et al., 1999), e através disso é capaz de regular o fluxo sanguíneo. Ele também está envolvido com a resposta imune, neurotransmissão, adesão de plaquetas e leucócitos, regula a angiogênese possivelmente por suprimir a produção de angiostatina (MATEO et al., 2008; MATSUNAGA et al., 2002). Além disso, é

mediador da produção basal de GnRH, estimulando a secreção de LH e foliculogênese (ROSSELLI; KELLER; DUBEY, 1998).

O óxido nítrico desempenha papel importante na regulação do fluxo sanguíneo placentário (WU; MEININGER, 2000) e, portanto, na transferência de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto. Além disso, o ON é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores de membrana celular na célula alvo e habitualmente, são transmembranosos em contato com citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinais intracelulares que interferem no metabolismo celular. Pelas suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do ON é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos, cujo organismo utiliza o ON em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Além disso, a arginina tem potente atividade secretagoga sobre várias glândulas endócrinas, atuando na secreção do hormônio do crescimento, da prolactina e insulina. Estimula a liberação do glucagon, polipeptídeo pancreático e catecolaminas adrenais (FERRAZ; PANTALEÃO, 2005; ILEYLAND et al., 2001).

### ***3.1 Arginina na nutrição de porcas em gestação e lactação***

Uma tecnologia que tem se mostrado promissora para uma melhor nutrição é a suplementação da arginina para as porcas em gestação e lactação. Estudos recentes apresentam a suplementação com aminoácidos como alternativa ao baixo consumo de ração durante a lactação e deficiências na composição láctea, tendo em vista que o leite é deficiente em alguns aminoácidos o que pode comprometer o desenvolvimento dos leitões (WU et al., 2004). Com isso tem-se sugerido a manipulação da dieta materna, com a suplementação com arginina, que pode alterar o perfil de vários componentes nutritivos do leite e proporcionar eficiente crescimento potencial dos leitões (LIMA, 2010).

Os animais jovens têm uma alta exigência de Arg (SOUTHERN; BAKER, 1983; FICKLER et al, 1994), devido à utilização de Arg por várias vias metabólicas (WU; MORRIS, 1998; LI et al, 2007). No entanto, a ingestão de Arg no leite de porca é baixa em relação à necessidade de deposição de proteína em leitões (DAVIS et al, 1994; WU; KNABE, 1994; KIM et al, 2007).

Os efeitos da arginina parecem ser devido à sua participação em regular a angiogênese, desenvolvimento vascular, funções da veia umbilical e placenta providenciando mais nutrientes e oxigênio da porca para os fetos (LIU et al., 2011).

A glândula mamária suína tem a capacidade de captar grandes quantidades de arginina e aminoácidos de cadeia ramificada, no entanto, a excreção desses aminoácidos no leite é bastante diminuída com relação à concentração inicial. Além do consumo de ração pelas porcas e da intensidade da amamentação dos leitões, a produção de leite também é influenciada pela angiogênese do tecido mamário e fluxo sanguíneo de glândulas mamárias, que melhoram a captação de nutrientes na glândula para a síntese de leite (TROTTIER et al., 1997).

Sabe-se que o ganho de peso da leitegada é correlacionado com a produção de leite ou concentração de nutrientes do leite (KING et al., 1993). O aumento do ganho de peso do leitão ou da leitegada em dietas de porcas suplementadas com arginina pode ser um indicativo de aumento da produção de leite ou aumento da concentração de nutrientes no leite (FONTES et al. 2010).

Estimativas com base no fornecimento de Arg do leite da porca e a exigência de Arg de leitões revelaram que o leite da porca fornece menos de 40% da exigência diária em leitões de sete dias de idade (WU et al., 2004). Tanto os dados metabólicos quanto os dados de desempenho indicam que uma deficiência de Arg é um importante fator limitante ganho de peso máximo de leitões alimentados com leite (KIM; WU, 2004; WU et al, 2004; FRANK et al, 2007). Aumentar a concentração de Arg no leite para os leitões poderia ser um meio eficaz de melhorar o seu crescimento.

A importância da arginina para a gestação da porca foi estudada por Mateo et al. (2007). Os autores verificaram que a suplementação com 1% de arginina a partir dos 30 dias até o parto, elevou o número de nascidos vivos e também o peso da leitegada ao nascimento.

Resultados do estudo de Mateo et al. (2008) indicam que o consumo voluntário e mudanças no peso vivo das porcas não foram afetados pela dieta suplementada com Arg, sugerindo que aumentos na concentração total de aminoácidos no leite não foram devidos a alterações no consumo alimentar proteico ou mobilização de proteínas corporal. Baseado na redução dos níveis de ureia no plasma, a suplementação com Arg parece aumentar a eficiência de utilização proteica para a síntese de proteínas do leite, devido ao aumento do fluxo sanguíneo, ocasionado pelo aumento da síntese de ON (WU; MEININGER, 2000), aumentando o fornecimento de nutrientes para as glândulas

mamárias e, conseqüentemente, produção de proteínas do leite e aumento do ganho de peso dos leitões lactentes.

Em um estudo com marrãs, Kim e Wu (2009) verificaram que a concentração de proteína no leite foi maior no tratamento com marrãs suplementadas com arginina do que nas fêmeas do tratamento controle, apesar do consumo ter sido o mesmo. Além disso, a suplementação com arginina dietética aumenta a concentração no plasma de insulina e reduzem os níveis de ureia no plasma, uns dos principais produtos nitrogenados da degradação de aminoácidos (MATEO et al., 2008). Essas informações indicam que há um aumento na utilização de aminoácidos pelas glândulas lactantes e melhora na eficiência de utilização de aminoácidos dietéticos para síntese de proteínas lácteas em fêmeas suínas suplementadas com arginina. Alimentos ricos em arginina como farelo de soja, amendoim, farinhas de peixe, etc, ou com abundância de citrulina, podem ter grande potencial em aumentar a produção de óxido nítrico e proliferação celular no tecido.

Moreira (2014) observou que a suplementação de L-arginina na ração de porcas pluríparas em lactação, melhorou o ganho de peso dos leitões, pela melhora da qualidade nutricional do leite das fêmeas, devido ao aumento da porcentagem e da produção diária de proteína e de gordura do leite dos animais.

Lemes (2016) avaliou o efeito da suplementação da ração de lactação com 1% L-Arginina sobre as características fisiológicas e de desempenho produtivo de matrizes suínas primíparas e o desempenho de suas respectivas leitegadas, e não observou efeitos da suplementação sobre o perfil nutricional do leite e os parâmetros fisiológicos das matrizes suínas, como os níveis de ácidos graxos não esterificados, creatina e uréia, e não também não houve efeito sobre o desempenho das matrizes suínas primíparas e de suas respectivas leitegadas.

Krogh et al (2017), estudaram o impacto do fornecimento de 25 g/d de L-Arg no fluxo plasmático mamário a partir do 30º dia de gestação até o desmame e, quantificaram a absorção de nutrientes mamários no final da gestação e no início e no pico da lactação, e verificaram que no pico de lactação os dois AA essenciais mais extraídos no pico da lactação foram Lis (38%) e Leu (51%), sugerindo que esses AA são os mais limitantes para a síntese láctea.

#### **4) Arginina e Valina na Glândula Mamária Suína**

A glândula mamária é uma estrutura tubulo-alveolar, cujos alvéolos estão conectados a um sistema de ductos através do qual o leite secretado flui para o canal do teto e pode ser removido através da sucção ou ordenha (BLACKBURN et al., 1989). A capacidade da glândula mamária é influenciada pelo número de células secretoras na glândula, a atividade dessas células e o tamanho e disposição dos alvéolos que eles formam (LANG et al., 2012). Imediatamente antes do parto, as células mamárias são convertidas de um estado não secretor para um estado secretor e há um gradual aumento da atividade secretora das células através dos estágios iniciais de lactação até o momento da produção máxima de leite (KNIGHT; PEAKER, 1984).

Na glândula mamária em lactação o tecido parenquimatoso é composto por estruturas epiteliais (por exemplo, alvéolos e ductos) e o tecido conjuntivo estromal associado. O estroma de uma glândula em lactação é composto de tecido conjuntivo em torno da estrutura epitelial (ARENDDT; KUPERWASSER, 2015). Os componentes celulares do tecido conjuntivo consistem em fibroblastos, vasos sanguíneos e leucócitos, enquanto que os componentes não-celulares incluem colágenos e outras proteínas do tecido conjuntivo. Além disso, um extenso tecido adiposo branco existe como parte do estroma da glândula em desenvolvimento.

Nos suínos, o número de glândulas mamárias varia de 14 a 20 (7-10 pares). As glândulas formam duas linhas paralelas, em ambos os lados da linha mediana ventral e que se estendem da região peitoral para a região inguinal, sendo o tecido secretor de cada glândula independente das glândulas adjacentes (HARTMANN et al., 1984)

A glândula mamária é um dos poucos tecidos em mamíferos que podem sofrer repetidos ciclos de crescimento, diferenciação funcional e regressão. O desenvolvimento das estruturas da glândula mamária é referido como mamogogênese, que começa no início do desenvolvimento fetal e prossegue além do início da lactação. A maioria do evento de mamogênese ocorre durante a gestação, e alguns hormônios da prenhez, como estrogênio e progesterona, são responsáveis pelo crescimento e maturação mamária (INMAN et al., 2015)

As fêmeas primíparas apresentam uma densidade celular significativamente maior em comparação com fêmeas múltíparas ao longo da lactação, sugerindo que as fêmeas primíparas possuem células secretoras menores e menos desenvolvidas (LANG et al., 2012).

O número de células mamárias e a quantidade de disponibilidade de nutrientes para essas células mamárias são os determinantes críticos da produção de leite. As porcas precisam de uma grande quantidade de AA para apoiar o crescimento do tecido mamário e a síntese do leite durante a lactação (KIM et al., 1999b). Alguns AA tais como leucina, isoleucina, valina e lisina são inibidores da arginase (HRABAK et al., 2008), uma enzima abundante que degrada arginina no tecido mamário (O'QUINN et al., 2002), aumentando a disponibilidade de arginina para síntese proteica do leite.

Trottier et al. (1997) relataram que 49,0 g/dia de AA essenciais foram absorvidos pelas glândulas mamárias da porca, mas apenas cerca de 14% deles foram acometidos principalmente como proteína no leite. Assim, 86% dos AA essenciais absorvidos pela glândula em lactação podem ser catabolizados localmente. No entanto, com exceção da arginina (O'QUINN et al., 2002) e AA de cadeia ramificada (CONWAY; HUTSON, 2000), não foram estabelecidas vias para o catabolismo de outros AA essenciais para o tecido mamário.

A quantidade de AA absorvida pela glândula mamária não muda (TROTIER et al., 1997), apesar do aumento do número de células epiteliais (KIM et al., 1999b) com aleitamento avançado, indicando uma diminuição taxa de transporte de AA por essas células. No entanto, a produção de leite é determinada pelo número de células epiteliais mamárias funcionais, que por sua vez, é determinada por fatores genéticos, que podem sofrer influências climáticas e nutricionais. Um fornecimento adequado de energia e proteína pode maximizar o crescimento mamário e a produção de leite (KIM et al., 1999),

Os aminoácidos de cadeia ramificada e arginina são amplamente degradados, enquanto o glutamato, a glutamina, a alanina, aspartato, asparagina, prolina e poliaminas são sintetizados ativamente pelo tecido mamário em lactação (LEI et al., 2012). O metabolismo dos AA desempenha um papel essencial na produção de leite, regulando o estado endócrino materno, a taxa de fluxo sanguíneo através da glândula mamária em lactação e a ativação da sinalização do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (WU, 2013)

Nos últimos anos os aminoácidos de cadeia ramificada receberam muita atenção (LI et al., 2009; LEI et al., 2012), pelo fato da absorção desses AA pela glândula mamária da porca ser muito maior do que a produção no leite, enquanto o oposto é verdadeiro para a glutamina (TROTIER et al., 1997; LI et al., 2009; MANJARIN et al., 2014).

LI et al., (2009), demonstraram que os BCAA são catabolizados extensivamente no tecido mamário em lactação para fornecer grupos amino para a biossíntese de outros aminoácidos, como o glutamato e a glutamina que são necessários para o crescimento neonatal e a maturação do trato digestivo (LEI et al., 2012).

O catabolismo do BCAA pela glândula mamária é iniciado pela transaminase BCAA na presença de  $\alpha$ -cetoglutarato para formar  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada e glutamato (LI et al., 2009). Assim, as concentrações de  $\alpha$ -cetoácidos no leite podem ser relativamente altas, e atuam como substratos energéticos para o intestino delgado de recém-nascidos lactentes.

Nas células epiteliais mamárias, os BCAA podem estimular seu crescimento e proliferação, além de melhorar a sua diferenciação funcional e aumentar a longevidade (WOLTER et al., 2002). Leucina e isoleucina demonstraram aumentar a síntese de proteínas em células mamárias bovinas através da regulação das taxas de fosforilação de mTOR e rpS6, ou mTOR, S6K1 e rpS6, respectivamente (APPUHAMY et al., 2002), enquanto vários mecanismos proteolíticos são responsáveis pelo catabolismo de proteínas, incluindo: a) a via ativada pelo cálcio; via proteolítica lisossomal; dependente de ATP via proteolítica da ubiquitina-proteassoma (REZAEI et al., 2015; CIECHANOVER, 2012). A função da valina sobre esse mecanismo ainda é desconhecida (ZHANG et al., 2017).

A arginina é deficiente nos leites de: porcas, vacas, humanos e muitos outros mamíferos (WU, 2013). Isso ocorre devido ao extenso catabolismo da arginina pelo tecido mamário suíno (O'QUINN et al., 2002) como exemplo, no 14º dia de lactação, a absorção de arginina pela glândula mamária da porca é de 31 g/d, mas a produção de arginina no leite é de apenas 6 g/d (MANJARIN et al., 2014). Assim, 81% da arginina absorvida do sangue arterial pela glândula em lactação é degradada localmente. Já a absorção da prolina pela glândula mamária é muito menor do que a produção no leite.

Estudos enzimáticos e metabólicos revelaram que o tecido mamário suíno expressa altas atividades de ambas arginase, tipo I (citossólica) e tipo II (mitocondrial), para hidrolisar arginina em ornitina e ureia (O'QUINN et al., 2002).

A maior parte da ornitina derivada da arginina é convertida em prolina pela ornitina aminotransferase e a pirrolina-5-carboxilato redutase (WU, 2013). O tecido mamário não contém atividade de pirrolina-5-carboxilato desidrogenase ou prolina oxidase; portanto, este tecido não pode converter arginina, ornitina ou prolina em glutamato ou glutamina (O'QUINN et al., 2002), o que explica a abundância de prolina

na proteína do leite. Já o óxido nítrico, melhora o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes pela glândula mamária em lactação (KIM; WU, 2009), devido à degradação extensiva da arginina pela arginase no epitélio mamário, a inibição desta enzima pode proporcionar uma nova abordagem efetiva para melhorar de forma benéfica o desempenho da lactação da porca e, conseqüentemente, o crescimento e sobrevivência dos leitões.

### III. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A suinocultura nos últimos anos tem focado cada vez mais na nutrição das matrizes suínas a fim de atenuar os problemas ocasionados pelo aumento da hiperprolificidade, como a alta desuniformidade das leitegadas e, conseqüente, com o aumento do número de leitões refugos ao desmame.

O uso de aminoácidos industriais como L-Arginina e a L-Valina na suplementação da ração de matrizes na gestação e lactação tem ganhado um grande destaque como uma alternativa para melhorar a eficiência produtiva na suinocultura, uma vez que suas funções como aminoácidos funcionais indicam que podem atuar em benefício de vários fatores envolvidos na produção de leite, e conseqüentemente, no desempenho da leitegada.

### REFERÊNCIAS

- ABREU, M.L.T et al. Atualizando a nutrição de porcas hiperprolíficas. **In: Simpósio Brasil Sul De Suinocultura**, 6., 2013, Chapecó. Anais... Chapecó: [s. n.], 2013. p. 70-92.
- ABREU, M.L.T.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M. Exigências nutricionais de matrizes suínas gestantes e lactantes. **In: IV Seminário Internacional de Aves e Suínos- Avesui**, p.33-59, 2005.
- ABUMRAD, N.; ROBINSON, R.; GOOCH, B.; LACY, W. The effect of leucine infusion on substrate flux across the human forearm. **J. Surg. Res.** 32: 453–63. 1982.
- AIRES, M. M. Fisiologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 934 p.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, London, n. 357, p. 593-615, Dec. 2001.

- APPUHAMY JRN, KNOEBEL NA, NAYANANJALIE WD, ESCOBAR J, HANIGAN MD. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MACT cells and bovine mammary tissue slices. **J Nutr.** 2012;142:484–91.
- ARENDRT LM, KUPERWASSER C. Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** 2015;20:9–25.
- BIXEL, M.G.; HUTSON, S.M.; HAMPRECHT, B. Cellular distribution of branched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. **J. Histochem. Cytochem.** 45: 685–94, 1997.
- BLACKBURN DG, HAYSEN V, MURPHY CJ. The origins of lactation and evolution of milk: A review with new hypothesis. **Mammal Rev.** 1989;19:1–26.
- BRODY, T. 1998. Nutritional biochemistry. **Academic Press.**
- BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. **J. Nutr.**, v.136, p.207S-211S, 2006.
- BURRIN, D.G.; STOLL, B.; CHANG, X.; VAN GOUDOEVER, J.B.; FUJII, H.; HUTSON, S.M.; REEDS, P.J. Parenteral nutrition results in impaired lactose digestion and hexose absorption when enteral feeding is initiated in infant pigs. **Am J Clin Nutr.** 78:461–70, 2003.
- BUSE, M.G. & REID, S.S. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. **J. Clin. Invest.** 56, 1250-61, 1975.
- CARTER, S. D., G. M. HILL, D. C. MAHAN, J. L. NELSSSEN, B. T. RICHERT, AND G. C. SHURSON. 2000. Effects of dietary valine concentration on lactational performance of sows nursing large litters. NCR- 42 Committee on Swine Nutrition. **J. Anim. Sci.** 78:2879–2884.
- CHEN, L.X.; YIN, Y.L.; JOBGEN, W.S.; JOBGEN, S.C.; KNABE, D.A.; HU, W.X.; WU, G. In vitro oxidation of essential amino acids by intestinal mucosal cells of growing pigs. **Livest Sci.** 109:19–23, 2007.
- CIECHANOVER, A. 2012. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Biochim. Biophys. Acta** 1824:3-13.
- CLOWES, E.J.; AHERNE, F.X.; BARACOS, V.E. Skeletal muscle protein mobilization during the progression of lactation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 288:E564–72, 2005.
- CONWAY, M. E.; HUTSON, S. M Mammalian branched-chain aminotransferases. **Methods in Enzymology.** Jan 2000, 324:355-365.
- CRAIG, A; HENRY, W; MAGOWAN, E . Effect of phase feeding and valine-to-lysine ratio during lactation on sow and piglet performance. **J. Anim. Sci.** 2016.94:3835–3843 doi:10.2527/jas2016-0648

CYNOBER, L.; HARRIS, R.A. Symposium on branched-chain amino acids: conference summary. **J. Nutr.**, v.136, p.333S-336S, 2006.

DAVIS, T.A.; NGUYEN, H.V.; GARCIAA-BRAVO, R.; FLOROTTO, M.L.; JACKSON, E.M.; LEWIS, D.S.; LEE, D.R.; REEDS, P.J. Amino acid composition of human milk is not unique. **J Nutr.**124:1126–32, 1994.

DESANTIAGO, S.; TORRES, N.; SURYAWAN, A.; TOVAR, A.R.; HUTSON, S.M. Regulation of branched-chain amino acid metabolism in the lactating rat. **J Nutr.**128:1165–71, 1998.

DEVI, M.; PARK, J. W; KIM, I. H. Effects of dietary valine:lysine ratios on lactation performance of primiparous sows nursing large litters. **R. Bras. Zootec.**, 44(12):420-424, 2015

DHANAKOTI, S.N; BROSNAN, J.T; HERZBERG, G.R; BROSNAN, M.E. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.259, n.3, p.437-442, Sept. 1990.

FERRANDO, A.A.; WILLIAMS, B.D.; STUART, C.A.; LANE, H.W.; WOLFE, R.R. Oral branched-chain amino acids decrease whole-body proteolysis. **J. Parenteral Enteral Nutr.** 19:47–54, 1995.

FICKLER, V. J., M. Kirchgessner, and F. X. Roth. 1994. The effect of dietary arginine supply on the N balance of piglets. 4. Communication on the importance of non-essential amino acids for protein retention. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** (Berl.) 73:159–168.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Artigo de Revisão. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. **Revista da Associação Médica Brasileira.** 46(3). p.265-71. 2000.

FLYNN, N.E; WU, G. An important role for endogenous synthesis of arginine in maintaining arginine homeostasis in neonatal pigs. **American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.271, n.5, p.1149-1155, Nov. 1996.

FONTES, D.O.; SOUZA , L. P. O.; SALUM ,G. M. **Como alimentar porcas que desmamam 30 leitões por ano.** Disponível em: <<https://pt.engormix.com/suinoicultura/artigos/alimentar-porcas-desmamam-leitoes-t36856.htm>>. Acessado em 15/10/2018.

FOXCROFT, G. R.; TOWN, S. Prenatal programming of postnatal performance – the unseen cause of variance. **Advances in Pork Production.** v.15, p. 269-279. 2004.

FOXCROFT, G.; BEE, G.; DIXON, W.; HAHN FOXCROFT, G.R. Recognizing the characteristics of our new dam lines. **Proceedings of Allen D. Leman Swine Conference**, 2005.

FRANK, J. W., J. ESCOBAR, H. V. NGUYEN, S. C. JOBGEN, W. S. JOBGEN, T. A. Davis, and G. Wu. 2007. Oral N-carbamylglutamate supplementation increases protein synthesis in skeletal muscle of piglets. **J. Nutr.** 137:315–319.

GAINES, A. M., R. D. BOYD, M. E. JOHNSTON, J. L. USRY, K. J. TOUCHETTE, AND G. L. ALLEE. 2006. The dietary valine requirement for prolific lactating sows does not exceed the National Research Council estimate. **J. Anim. Sci.** 84:1415–1421.

GELFAND, R.A.; GLICKMAN, M.G.; JACOB, R.; SHERWIN, R.S.; DEFRONZO, R.A.; Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans. **Am. J. Physiol.** 250: E407–13, 1986.

GOLDBERG, A.L., CHANG, T.W. Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. **Fed Proc.** 37:2301–7, 1978.

HARPER, A.E.; MILLER, R.H.; BLOCK, K.P. Branched-chain amino acid metabolism. **Annu Rev Nutr.** 4:409–54, 1984.

HARRIS, R.A.; HAWES, J.W.; POPOV, K.M.; et al. Studies on the regulation of the mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase complexes and their kinases. **Adv. Enzyme Reg.** 37: 271–93, 1997.

HARRIS, R.A.; JOSHI, M.; JEOUNG, N.H. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.313, n.2, p.391-396, 2004.

HARRIS, R.A.; JOSHI, M.; JEOUNG, N.H.; OBAYASHI, M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. **J. Nutr.**, v.135, p.1527S-1530S, 2005.

HARTMANN PE, WHITELY JL, WILLCOX DL. Lactose in plasma during lactogenesis, established lactation and weaning in sows. **J Physiol.** 1984;347:453–63.

HAYNES, T.E.; KNABE, D.A.; SHIMOTORI, K.; SATO, K.; FLYNN, N.E.; BLACK, D.D.; RHOADS, J.M.; WU, G. L-Glutamine or L-alanyl-glutamine dipeptide prevents hydrogen peroxide or lipopolysaccharide-induced enterocyte death. **Amino Acids.** 37:131–42, 2009.

HRABAK, A.; BAJOR, T.; MESZAROS, G. The inhibitory effect of various indolyl amino acid derivatives on arginase activity in macrophages. **Amino Acids**, Wien, v. 34, p. 293–300, 2008.

HUTSON, S.M.; SWEATT, A.J.; LANOUE, K.F. Branchedchain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. **J. Nutr.**, v.135, p.1557S-1564S, 2005.

IGNARRO, L. J. et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 34, n. 6, p. 879-886, Dec. 1999.

ILEYLAND, D. K. et al. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. **JAMA**, Chicago, v. 286, n. 8, p. 944-953, 2001.

INMAN JL, ROBERTSON C, MOTT JD, BISSELL MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**. 2015;142:1028–42.

JI, F.; WU, G.; BLANTON, J.R. Jr.; 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.; AHERNE, F.X.; FOXCROFT, G.R.. Effect of Nutrition on Embryonal Mortality in Gilts: Association with Progesterone. **Journal of Animal Science**. v. 74, p.620–624. 1996.

JONES, D.B.; STAHLY, T.S. Impact of amino acid nutrition during lactation on luteinizing hormone secretion and return to estrus in primiparous sows. **J.Anim.Sci.**, v.77, n.6, p.1523-1531, 1999.

JURASINSKI, C.; GRAY, K.; VARY, T.C. Modulation of skeletal muscle protein synthesis by amino acids and insulin during sepsis. **Metab. Clin. Exp.** 44: 1130–8, 1995.

KIM SW, WU G, BAKER DH. Amino acid nutrition of breeding sows during gestation and lactation. **Pigs News Inform** , 2205; 26:N89–N99

KIM SW, WU G. Regulatory role for amino acids in mammary gland growth and milk synthesis. **Amino Acids**. 2009;37:89–95.

KIM, S. W. et al. Changes in tissue composition associated with mammary gland growth during lactation in sows. **J. Anim. Sci**, Champaign, v. 77, p. 2510-2516, 1999. 57

KIM, S. W. et al. Effect of nutrient intake on mammary gland growth in lactating sows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 12, p. 3304-3315, 1999b.

KIM, S. W., R. D. MATEO, Y. L. YIN, AND G. WU. 2007. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 20:295–306.

KIM, S. W.; BAKER, D. H. AND EASTER, R. A. 2001. Dynamic ideal protein and limiting amino acids for lactating sow: The impact of amino acid mobilization. **Journal of Animal Science** 79:2356-2366.

KIM, S. W.; MCPHERSON, R. L.; WU, G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 625–630, 2004.

KIM, S. W.; WU, G.; BAKER, D. H. Ideal protein and dietary amino acid requirements for gestating and lactating sows. **Pig News and Information**, Farnham, v. 26, n. 4, p. 89-99, 2005.

- KIM, S.W.; HURLEY, W.L.; WU, G.; JI, F. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. **J Anim Sci.** 87 Suppl E:E123–32, 2009.
- KING, R. H.; RAYNER, C. J.; KERR, M. A note on the amino acid composition of sow's milk. **Animal Production**, Cambridge, v. 57, p. 500–502, 1993.
- KNIGHT, CH; PEAKER, M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion – **Experimental Physiology**, 1984 - Wiley Online Library
- KROGH, U; OKSBJERG, N; STORM, A. C. ET AL. Mammary nutrient uptake in multiparous sows fed supplementary arginine during gestation and lactation. **J Anim Sci.** 2017 jun; 95 (6): 2517-2532. doi: 10.2527 / jas.2016.1291.
- LACASSE, P., AND C. G. PROSSER. 2003. Mammary blood flow does not limit milk yield in lactating goats. **J. Dairy Sci.** 86:2094–2097.
- LANG, S. L. C.; IVERSON, S. J.; BOWEN, W. D. Primiparous and multiparous females differ in mammary gland alveolar development: implications for milk production. **The Journal of Experimental Biology** 215, 2904-2911. 2012. doi:10.1242/jeb.067058
- LEHNINGER, N. D. L. 2006. **Princípios de bioquímica**. São Paulo.
- LEI J, FENG D, ZHANG Y, ZHAO FQ, WU Z, SAN GABRIEL A, FUJISHIMA Y, UNEYAMA H, WU G: Nutritional and regulatory role of branched-chain amino acids in lactation. **Front Biosci.** 2012;17:2725–39.
- LEMES, M. A. G. **ARGININA PARA MATRIZES SUÍNAS PRIMÍPARAS EM LACTAÇÃO**. 2016. 59p. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- LI P, KNABE DA, KIM SW, LYNCH C, HUTSON S, WU G. Lactating porcine mammary tissue catabolized branched-chain amino acids for glutamine and aspartate synthesis. **J Nutr.** 2009;139:1502–9.
- LI, P., Y. L. YIN, D. LI, S. W. KIM, AND G. WU. 2007. Amino acids and immune function. **Br. J. Nutr.** 98:237–252.
- LIMA, D. **Dietas suplementadas com arginina para fêmeas suínas hiperprolíferas no período final da gestação e na lactação** / Daniele de Lima. – Lavras : UFLA, 2010. 61 p. : il.
- LIU, B. R.; JEFFREY, Y; WINIARZ, G; JENNCHIANG, H. ET AL. Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism. **Biomaterials**. Vol.32, Issue 13, May 2011, Pages 3520-3537.
- LIU, X.D., WU, X., YIN, Y.L. et al. **Amino Acids** (2012) 42: 2111. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0948-5>

MANJARIN R, BEQUETTE BJ, WU G, TROTTIER NL. Linking our understanding of mammary gland metabolism to amino acid nutrition. **Amino Acids**. 2014;46:2447–62.

MATEO, R. D., G. WU, F. W. BAZER, J. C. PARK, I. SHINZATO, AND S. W. KIM. 2007. Dietary L-arginine supplementation enhances gestation performance in gilts. **J. Nutr.** 137:652–656.

MATEO, R.D; WU, G; MOON, H.K; CARROLL, J.A; KIM, S.W. Effects of dietary arginina supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. **Journal Animal Science**, Champaign, v.86, n.4, p.827-835, Apr. 2008.

MATSUNAGA, T. et al. **Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide**. *Circulation*, Baltimore, v. 105, n. 18, p. 2185-2191, Apr. 2002.

MCPHERSON, R.L.; JI, F.; WU, G.; KIM, S.W. Fetal growth and compositional changes of fetal tissues in the pigs, **J. Anim. Sci.**, v. 82, pp. 2534-2540, 2004.

MOREIRA, R.H.R. **Arginina para porcas pluríparas em lactação submetidas a estresse por calor**. Dissertação apresentada ao Departamento de Zootecnia - Universidade Federal de Lavras, fev 2014.

MOSER S, TOKACH M, DRITZ S, GOODBAND R, NELSEN J, LOUGHMILLER J. The effects of branched-chain amino acids on sow and litter performance. **J Anim Sci**. 2000; 78:658–67.

NOVAES, M. R. C.; PANTALEÃO, C. M. ARGININA: BIOQUÍMICA, FISIOLÓGIA E IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS EM PACIENTES COM CÂNCER GASTROINTESTINAL. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, 14(1):65-75, jan./fev., 2005.

NRC. 2012. **Nutrient requirements of swine**. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

O'QUINN, P.R.; KNABE, D.A.; WU, G. Arginine catabolism in lactating porcine mammary tissue. **J Anim Sci**. 80:467–74, 2002.

PANZARDI, A. et al. Eventos cronológicos da gestação: da deposição dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino ao desenvolvimento dos fetos. In: **Suinocultura em ação: a fêmea suína gestante**. 4. ed. Porto Alegre: UFRS, 2007. p. 43-71

REEDS, P.J.; BURRIN, D.G.; DAVIS, T.A.; FIOROTTO, M.L.; STOLL, B.; VAN GOUDOEVER, J.B. Protein nutrition of the neonate. **Proc Nutr Soc**. 59:87–97, 2000.

REZAEI R. **Nutritional and Regulatory Roles for Branched-Chain Amino Acids in Milk Production by Lactating Sows**. 2015. Texas A & M University.

RICHERT, B.T.; GOODBAND, R.D.; TOKACH, M.D.; NELSEN, J.L. Increasing valine, isoleucine, and total branched-chain amino acids for lactating sows. **J Anim Sci**.75:2117–28, 1997.

- ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Braz. J. Pharm. Sci.** vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 3-24, Jan./Feb. 1998.
- SELF, J.T.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; HU, J.; BAZER, F.W.; WU, G. Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. **Biol Reprod.**70:1444–51, 2004.
- SHIELDS, R.G.; MAHAN, D.C.; MAXSON, P.F. Effect of dietary gestation and lactation protein levels on reproductive performance and body composition of first-litter female swine. **Journal of Animal Science.** v.60, p.179–189. 1985.
- SHIMOMURA, Y.; OBAYASHI, M.; MURAKAMI, T.; HARRIS, R.A. Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 4:419–23, 2001.
- SILVA, B. Nutrição de fêmeas suínas de alta performance reprodutiva nos trópicos. **In: Simpósio Internacional De Produção Suína**, 5., 2010, Campinas. Anais... Campinas: Unicamp, 2010. 1 CD ROM.
- SOUTHERN, L. L., AND D. H. BAKER. 1983. Arginine requirement of the young pig. **J. Anim. Sci.** 57:402–412.
- STOLL, B. et al. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein- fed piglets. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 606-614, 1998.
- STRATHE, V.; BRUUN, T. S.; ZERRAHN J.-E. et al. The effect of increasing the dietary valine-to-lysine ratio on sow metabolism, milk production, and litter growth1. **J. Anim. Sci.** 2016.94:155–164 doi:10.2527/jas2015-9267.
- SURYAWAN, A.; HAWES, J.W.; HARRIS, R.A.; SHIMOMURA, Y.; JENKINS, A.E.; HUTSON, S.M.; A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. **Am J Clin Nutr.** 68:72–81, 1998.
- TOVAR, A.R.; BECERRIL, E.; HERNANDEZ-PANDO, R.; LOPEZ, G.; SURYAWAN, A.; DESANTIAGO, S.; HUTSON, S.M.; TORRES, N. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 280:E480–8, 2001.
- TROTTIER, N.L.; SHIPLEY, C.F.; EASTER, R.A. Plasma amino acid uptake by the mammary gland of the lactating sow. **J Anim Sci.** 75:1266–78, 1997.
- WANG, J.; CHEN, L.X.; LI, P.; LI, X.L.; ZHOU, H.J.; WANG, F.L.; LI, D.F.; YIN, Y.L.; WU, G. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. **J Nutr.**138:1025–32, 2008.

WOLTER BF, ELLIS M, CORRIGAN BP, DEDECKER JM. The effect of birth weight and feeding supplemental milk replacer to piglets during lactation on preweaning and postweaning growth performance and carcass characteristics. **J Anim Sci.** 2002;80:301–8.

WU G, FLYNN N E, KNABE D A. 2000. Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. **American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)**, 279, E395–E402.

WU G. **Amino Acids: Biochemistry and Nutrition**. Boca Raton: CRC Press; 2013.

WU, G. **Amino Acids (2009)** 37: 1. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

WU, G. et al. Arginine degradation in developing porcine enterocytes. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 271, p. G913–G919, 1996.

WU, G. et al. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, n. 12, p. 2342-2349, Dec. 1997.

WU, G., AND C. J. MEININGER. 2000. Arginine nutrition and cardiovascular function. **J. Nutr.** 130:2626–2629.

WU, G.; BAZER, F.W.; CUDD, T.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E. Maternal nutrition and fetal development, **J. Nutr.**, v. 134 , p. 2169-2172, 2004.

WU, G.; KNABE, D.A. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrums and milk. **J Nutr.** 124:415–24, 1994.

WU, G.; MEININGER, C. J. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 61-86, Jan. 2002.

WU, G.; MORRIS JR., S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, **Biochem. J.** 336, pp. 1-17, 1998.

WU, G.; THOMPSON, J.R.; SEDGWICK, G.; DRURY, M. Formation of alanine and glutamine in chick (*Gallus domesticus*) skeletal muscle. **Comp Biochem Physiol B.** 93:609–13, 1989.

WU, G; JAEGER, L.A; BAZER, F.W; RHOADS, J.M. Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. **Journal of nutrition Biochemistry**, London, v.15, n.8, p.442-451, Aug. 2004.

WU, G; MORRIS, S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, London, v.336, n.11, p.1-17, Nov. 1998

XU, Y.; ZENG, Z. XU, X. et al. Effects of the standardized ileal digestible valine : lysine ratio on performance, milk composition and plasma indices of lactating sows. **Animal Science Journal** (2017) 88, 1082–1092 doi:10.1111/asj.12753

ZHANG, S; ZENG, X; REN, M.; MAO, X; et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology** (2017) 8:10.DOI 10.1186/s40104-016-0139.

## SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

### ARTIGO 1- EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA E L-VALINA NA RAÇÃO DE LACTAÇÃO SOBRE A GLÂNDULA MAMÁRIA DE MATRIZES SUÍNAS HIPERPROLÍFICAS

#### I. INTRODUÇÃO

A produção de leite das matrizes suínas, assim como de outras espécies, depende da disponibilidade de nutrientes, dos fatores genéticos e ambientais, bem como da formação da glândula mamária, esses pontos são determinantes para a síntese de leite (KIM et al., 1999).

A glândula mamária é um dos poucos tecidos em mamíferos que podem sofrer repetidos ciclos de crescimento, diferenciação funcional e regressão (INMAN et al., 2015). A sua formação ocorre principalmente no terço final da gestação (JI et al., 2005) e, imediatamente antes do parto, as células mamárias iniciam a secreção de leite havendo um aumento gradual da atividade secretora das células através dos estágios iniciais de lactação até o momento da produção máxima de leite (KNIGHT; PEAKER, 1984). Este aumento na atividade secretora é influenciado pelo número de células na glândula, pela atividade dessas células e o tamanho e disposição dos alvéolos que elas formam (AKERS, 2002).

Aminoácidos da proteína da dieta são necessários para apoiar a produção de leite durante a lactação, pois ocorre um aumento do fluxo sanguíneo e a alta taxa de extração de aminoácidos na glândula mamária (WU, 2009).

A arginina precursora na síntese de muitas moléculas biológicas, incluindo poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) e óxido nítrico (WU; MORRIS, 1998), que estimulam a proliferação e migração celular, remodelação celular, angiogênese e dilatação dos vasos sanguíneos para aumentar o fluxo sanguíneo (WU, 2009).

A valina possui a maior taxa de oxidação do que qualquer AA na glândula mamária (KIM et al., 2001), seu papel na síntese do leite não é bem compreendido, mas um estudo em porcas de MOSER et al., (2000), descobriram que apenas suplementação de valina tende a aumentar o nitrogênio do leite, mas não isoleucina ou leucina.

O catabolismo da arginina (O'QUINN et al., 2002) e aminoácidos de cadeia ramificada (CONWAY; HUTSON, 2000) já foram amplamente estudado no tecido mamário, entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes que

regulam a função e proliferação do epitélio mamário, provavelmente mediada por mudanças em larga escala na expressão gênica. Assim o objetivo deste estudo, foi analisar a influência da suplementação de L-Arginina e L-Valina na dieta de matrizes suínas hiperprolíficas durante a lactação sobre a diferenciação das células do epitélio mamário e a expressão gênica de transportadores de aminoácidos, ácidos graxos e proteínas do leite.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, protocolo 053/2015, e conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

As matrizes foram transferidas para as salas de maternidade aos 109 dias de gestação. Na transferência, as fêmeas foram pesadas em balança com precisão de 1,0 Kg (Toledo<sup>®</sup> MGR 2000) e alojadas em gaiolas individuais (68 x 193 cm) na maternidade, em salas com capacidade para oito fêmeas. Cada baía dispunha de um escamoteador dotado de lâmpada infravermelha (Empalux<sup>®</sup> 127V/250W) para aquecimento dos leitões.

A ração (TABELA 1) foi fornecida quatro vezes ao dia na quantidade fixa de 6000 g/dia, durante o período de 21 dias de lactação. As sobras de ração foram retiradas dos comedouros e mensuradas todos os dias pela manhã. As matrizes suínas tiveram livre acesso à água, em bebedouros tipo concha, e eram levantadas ao menos quatro vezes ao dia para estimular o consumo de ração e água.

Nas primeiras 48 horas após o parto manejou-se os leitões de modo a manter ao menos 11 leitões por matriz, sendo esses leitões assistidos de tal forma que lhes fossem garantidas as primeiras mamadas do colostro. Aos sete dias de idade os leitões machos foram castrados. Os leitões também tiveram livre acesso à água e não receberam ração durante a fase de lactação.

Foram utilizadas 20 matrizes suínas (1 a 3 partos) em lactação de linhagem híbrida comercial hiperprolífica, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos por: 1) ração de lactação sem suplementação de aminoácidos industriais (CONT); 2) ração CONT suplementada com 1% de L-Arginina (L-Arg); 3) ração CONT suplementada

com 120% de L-Valina referente ao nível de lisina (L-Val) e 4) associação dos tratamentos 2 e 3 (L-Arg+L-Val).

Tabela 1 – Composição de ingredientes e valores nutricionais das rações experimentais fornecidas às matrizes durante os 21 dias de lactação.

Ingredientes	CONT	L-Arg	L-Val	L-Arg+L-Val
Milho	57,48	57,59	57,49	57,48
Farelo de Soja	32,25	32,25	32,25	32,25
Óleo de Soja	5,18	5,17	5,17	5,18
Fosfato Bicálcico	1,75	1,75	1,75	1,75
Caulim	1,48	0,48	0,52	---
L-Arginina	----	1,00	---	1,00
L-Valina	----	----	0,48	0,48
Calcário	0,810	0,810	0,811	0,810
Sal	0,534	0,534	0,533	0,535
L-Lisina HCl	0,130	0,130	0,127	0,130
Cloreto de Colina	0,120	0,120	0,120	0,120
Mistura Mineral <sup>2</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100
Mistura Vitamínica <sup>3</sup>	0,050	0,050	0,100	0,100
DL-Metionina	0,027	0,027	0,024	0,027
L-Treonina	0,023	0,023	0,020	0,023
BHT	0,010	0,010	0,010	0,010
<b>Composição Nutricional</b>				
Energia Metabolizável, kcal/kg	3450	3450	3450	3450
Cálcio, %	0,830	0,830	0,830	0,830
Fósforo, %	0,430	0,430	0,430	0,430
Proteína Bruta, %	19,27	19,27	19,27	19,34
Lisina Digestível, %	1,050	1,050	1,050	1,050
Metionina + Cistina Digestíveis, %	0,567	0,567	0,567	0,567
Treonina Digestível, %	0,672	0,672	0,672	0,672
Triptofano Digestível, %	0,214	0,214	0,214	0,213
Valina Digestível, %	0,816	0,816	1,260	1,260
Arginina Digestível, %	1,224	2,155	1,224	2,155
Sódio, %	0,230	0,230	0,230	0,230

<sup>1</sup> Seguindo as recomendações de Rostango et al., (2011).

<sup>2</sup> Conteúdo mínimo por quilo do produto: ferro 80g; cobre 12g; cobalto 1.000mg; iodo 1.000mg; manganês 40g e zinco 100g.

<sup>3</sup> Conteúdo mínimo por quilo do produto: vitamina A 10.000.000UI; vitamina D3 1.400.000UI; vitamina E 30.000g; vitamina K3 2.800mg; vitamina B1 1.800mg; vitamina B2 5.600mg;

vitamina B6 1.600; vitamina B12 18.000 $\mu$ g; pantotenato de cálcio 20g; niacina 30g; ácido fólico 1.000mg; biotina 240mg; selênio 200mg e B.H.T. 5.000mg.

### ***Coletas durante o abate***

Aos 21 dias após o parto os leitões foram desmamados sendo pesadas todas as matrizes, e seus leitões individualmente.

Após a pesagem, as matrizes foram insensibilizadas por eletronarcole e abatidas por meio da secção da artéria cervical e da veia cava cranial. Posteriormente, foi feita a secção do aparelho mamário em sua totalidade, eliminando o excesso de tegumento, e realizada a dissecação de cada glândula referente a cada teto (sem modificar a orientação da mesma), para a pesagem individual de cada glândula mamária.

Os fragmentos de tecidos foram coletados dos três primeiros pares de glândula mamária por meio de uma secção de 04 cm caudais do orifício do teto e no sentido mediolateral, na sequência fez-se um segundo corte, paralelo ao primeiro, distando a 01 cm deste.

A partir da faixa de tecido obtida, foram retiradas dez amostras de 0,25 cm<sup>3</sup>, que foram armazenadas em tubos contendo 05 mL de RNA *holder*. Os tubos foram então armazenados em geladeira a 04° C para que, posteriormente, essas amostras fossem usadas para avaliação da expressão gênica. Sendo transferidas para freezer a -80°C decorridas 24 horas após a obtenção das amostras.

A partir da mesma amostra de tecido, foram retirados dois fragmentos de 01 cm<sup>3</sup> que foram armazenados em tubos contendo 15 mL de formalina a 10%, para posterior análise histológica e de imunohistoquímica. Esses tubos foram estocados à temperatura ambiente. Vinte quatro horas após a amostragem, esses fragmentos foram transferidos para tubos contendo 15 mL de álcool 70%.

O processo de obtenção das amostras foi repetido para os três pares de glândulas mamárias craniais, no entanto para esse estudo utilizamos o segundo par de glândulas mamárias. O tempo decorrido entre o abate e a obtenção das amostras foi inferior à uma hora.

### ***Expressão gênica (RT-qPCR)***

A análise da expressão gênica foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) do Departamento de Zootecnia da UFV. Foram utilizados cinquenta miligramas de tecido glandular para a extração de RNA, sendo utilizado nesse procedimento a combinação de trizol (Life Technologies, Carlsbad, 5 EUA) e RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizado de acordo com o protocolo Goscript Reverse Transcription System (Promega, Madison, EUA) em Verich 96 Wellthermocycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Sequências de primers para os genes BCATc (aminotransferases da cadeia ramificada citosólica), BCATm (aminotransferases da cadeia ramificada mitocondrial), SLC7a7 e SLCa9 (transportadores de aminoácidos), CSN2 (beta caseína); LABA (Alfa -Lactoalbumina), SLC27a1, SLC27a2 e SLC27a4 (Transportadores de ácidos graxos de cadeia longa) foram obtidas a partir do banco de dados (TABELA 2), GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) usando a ferramenta PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

Os primers tiveram sua especificidade verificada usando a ferramenta BLAST Nucleotide (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A otimização para cada par de primers foi realizada (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os primers foram utilizados para PCR quantitativa reversa (RT-qPCR) com GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) em ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

O gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gene de controle endógeno, foi selecionado com base na estabilidade de amplificação, eficiência de RT-qPCR e resultados do algoritmo geométrico Best Keeper (PFAFFL et al., 2004). Os valores de Ct de GAPDH foram usados para normalizar a expressão de genes alvo (VANDESOMPELE et al., 2002). A expressão relativa do gene de interesse foi calculada por:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para análise de expressão gênica os dados de Ct foram analisados usando o QPCR-mixed macro no SAS, baseado em modelos mistos de acordo com Steibel et al., (2009). Best Keeper foi usado para obter o coeficiente de correlação de Pearson entre genes alvo (PFAFFL et al., 2004). O modelo matemático delineado foi:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + r_j + t_i r_j + e_{ij},$$

Onde:  $Y_{ij}$  = valor observado na parcela que recebeu o tratamento  $i$ , na glândula  $j$ ;  $\mu$  = efeito geral da média;  $t_i$  = efeito do tratamento  $i$ ;  $r_j$  = efeito da glândula  $j$ ;  $e_{ij}$  = erro aleatório da parcela que recebeu o tratamento  $i$ , na glândula  $j$ .

Tabela 2 - Sequências de primers usados para amplificação nas reações de PCR em tempo real

Genes	GenBank nº.		Sequência
BCATm (BCAT2)	XM_005664688.2	F	TGCCTCATCCAGCTTCA
		R	GTGGTCTGTGAATGTCTTCC
BCATc (BCAT1)	XM_013997793.1	F	CCGCTAGATGGCATCATTC
		R	GGTACCTCTCTGACACCTT
SLC7A7 (y+LAT1)	NM_001110421.1	F	TGGAAGATGGAGGAGAGATG
		R	CTCTGGCTGGTAGGAGATAA
SLC7A9 (b0+)AT	NM_001110171.1	F	CTCTCTTGTCCTGTTTCT
		R	GGCCGCTCAGCATAAATAG
PTGS2 (COX2)	NM_214321.1	F	CTTTCTGCTGAAGCCCTATC
		R	TACCAGAAGGGCAGGATAC
CSN2	NM_214434.2	F	CTTCTTGTCCTCCACTTTGG
		R	GAGTTCTTCCTTCGCTCTTG
Lalba	NM_214360.1	F	GACAATGGCAGCACAGAA
		R	CCAGGAATTTGTACAGGAG
SLC27a1	NM_001083931.1	F	CATCGGCTTCCTTGATGAC
		R	GCTACTGGCCTCAATGTTC
SLC27a2	JX092264.1	F	GCGGTCTTCATGGGTAATG
		R	CGCGGATGTTGTAGTTGAG
SLC27a4	XM_013993903.1	F	GAAGTTCTAACACGGATGGG
		R	GTATAGGGCAGGAGTGGAA
GAPDH	NM_001206359.1	F	CAAAGTGGACATTGTCCGATCA
		R	AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT

BCATc (aminotransferases da cadeia ramificada citosólica), BCATm (aminotransferases da cadeia ramificada mitocondrial), SLC7a7 e SLCa9 (transportadores de aminoácidos), PTGS2 (COX2) (Prostaglandina sintase 2)CSN2 (beta caseína); LABA (Alfa -Lactoalbumina), , SLC27a1, SLC27a2 e SLC27a4 (Transportadores de ácidos graxos de cadeia longa).

### ***Histologia***

Os ensaios histológicos foram realizados na Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. As amostras de tecido das glândulas mamárias coletadas e armazenadas em álcool 70% foram desidratadas em bateria com gradiente alcoólico crescente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina a 60 °C.

Foram obtidos cortes histológicos de 3,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  de espessura, que foram colocados em lâminas histológicas secas em estufa a 37°C overnight.

Para avaliar a morfologia da glândula mamária ao microscópio de luz e mensurar a densidade, a área e o diâmetro dos alvéolos, os cortes histológicos foram desparafinados e reidratados, segundo métodos histológicos de rotina, e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (BANCROFT et al., 2008).

As contagens de células foram realizadas em dez imagens aleatórias selecionadas de cada amostra. A área dos lúmens alveolares e o diâmetro foram mensurados em 250 alvéolos dentre as 10 imagens selecionadas aleatoriamente de cada amostra (área e diâmetro alveolar). As mesmas imagens foram usadas para estimar a densidade alveolar, dividindo a área de cada alvéolo pela área total da imagem.

As áreas de tecido conjuntivo ou porções da imagem que não contém tecido secretor, como as imagens tiradas próximas das margens das amostras histológicas, foram subtraídas da área de imagem total antes de se calcular a densidade alveolar, conforme o sugerido por Lang et al. (2012).

As lâminas histológicas foram analisadas no Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica do Departamento de Zootecnia da UFLA, usando microscópio Olympus CX31 (Olympus, Japão) acoplado a câmera digital Altra SC30 (Olympus, Japão) usando o programa AxioVision (Carl Zeiss, Alemanha), e foi utilizado o software analisador de imagens Image J® 6.0.

### ***Imunohistoquímica***

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados no Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica do Departamento de Zootecnia da UFLA. A preparação das lâminas foi a mesma descrita para as análises histológicas, seguindo a metodologia de Bancroft et al. (2008), com algumas adaptações. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida e todos os procedimentos de lavagem foram constituídos de três sucessivas imersões de cinco minutos em solução tampão fosfato salina 0,1 M pH 7,20 PBS. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi feito pela incubação em reagente Peroxidase Block (Dako Cytomation, EUA) por 30 minutos, seguido de uma lavagem em PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo foi feito pelo tratamento dos cortes com reagente Block Serum (Dako Cytomation, EUA) por 15 minutos. Logo em seguida, os cortes histológicos foram novamente lavados em PBS,

incubados com anticorpo monoclonal anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen; PC 10 - Dako® A/S. Denmark), na diluição 1:500 a 4° overnight. Posteriormente, foram lavados em PBS, incubados por 30 minutos com anticorpo secundário anti-coelho e anti-rato EnVision+System/HRP (Dako Cytomation, EUA). Após mais uma lavagem, os cortes histológicos foram revelados pelo método enzimático utilizando 3,3-tetra-hidrocloreto diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation, EUA), imersos em água destilada para parar a reação após cerca de 2 minutos. A contracoloração foi feita com hematoxilina e as lâminas montadas com lamínula.

O número de alvéolos secretores positivos para PCNA foram avaliados, identificados pela coloração marrom, sendo amostrados doze campos por amostra, em áreas representativas com aumento de 400x. As lâminas foram analisadas através de microscópio óptico OLYMPUS CX31, com câmera OLYMPUS SC30 associada, e foi utilizado o software analisador de imagens Image J®.

### ***Análise estatística***

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância. Para analisar a normalidade dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk e, quando estes não apresentaram essa distribuição, foi realizada a transformação usando PROCRAK (SAS INSTITUTE INC, 2009).

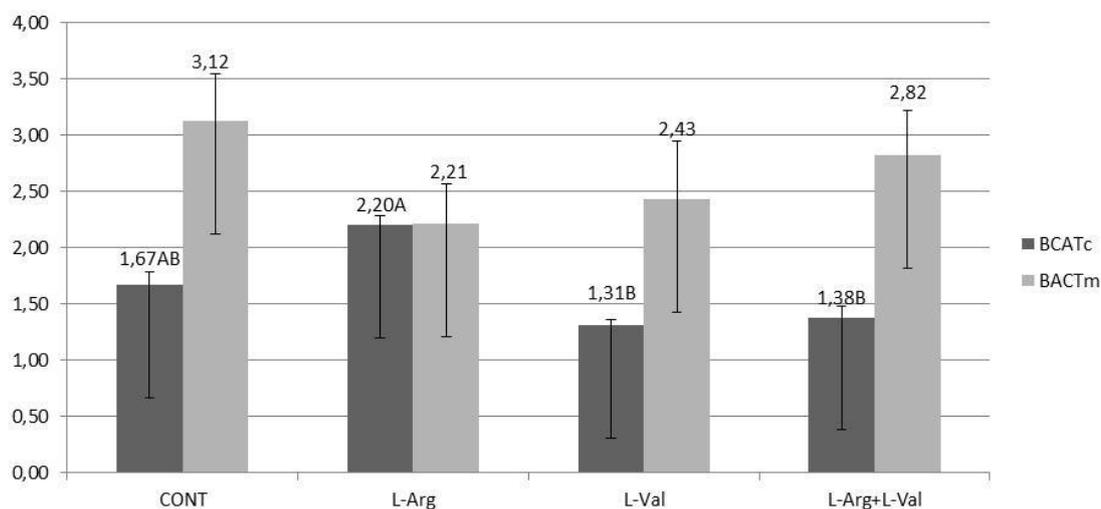
O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo cada matriz foi considerada uma unidade experimental. As diferenças foram consideradas  $P < 0,05$ . Foi adotado o teste de Tukey para comparação das médias. Os dados foram submetidos ao pacote estatístico do *software* SAS 9.3.

## **III. RESULTADOS**

### ***Expressão gênica (RT-qPCR)***

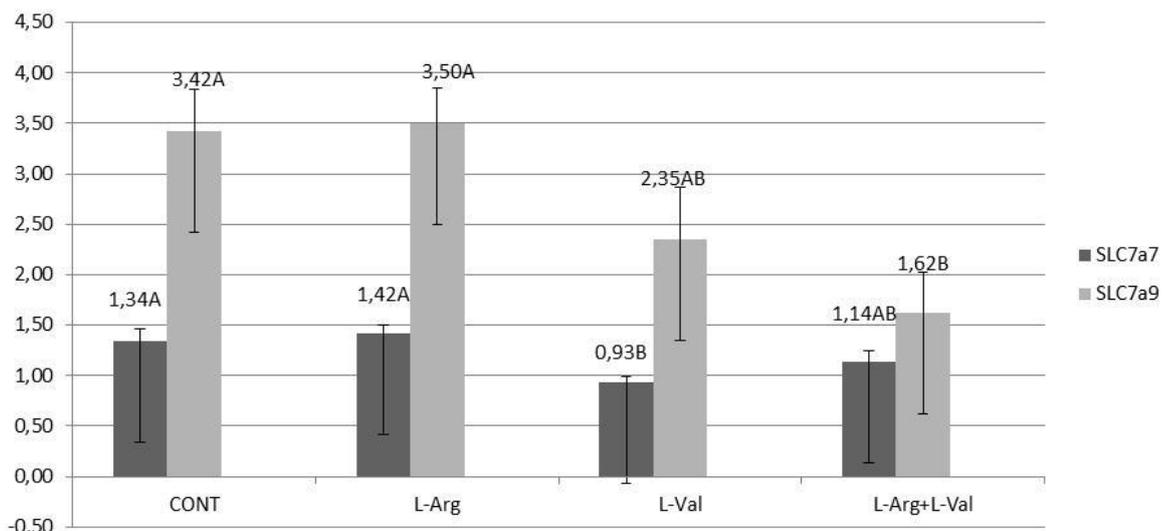
A suplementação com os aminoácidos não influenciou a expressão da BCAT<sup>m</sup>, no entanto, a expressão gênica da BCAT<sup>c</sup> ( $P=0,003$ ) foi maior no tratamento com L-Arginina quando comparado as matrizes do tratamento com L-Val e L-Arg+L-Val, mas foi semelhante ao tratamento controle (FIGURA 1).

Figura 1 - Expressão de RNA mensageiro de genes que codificam as enzimas aminotransferases de cadeia ramificada (BCAT) em tecido mamário de matrizes suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arginina e L-Valina quantificados por RT-qPCR. BCATc (citossólica); BCATm (mitocondrial). Valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Tukey  $P < 0,05$ .



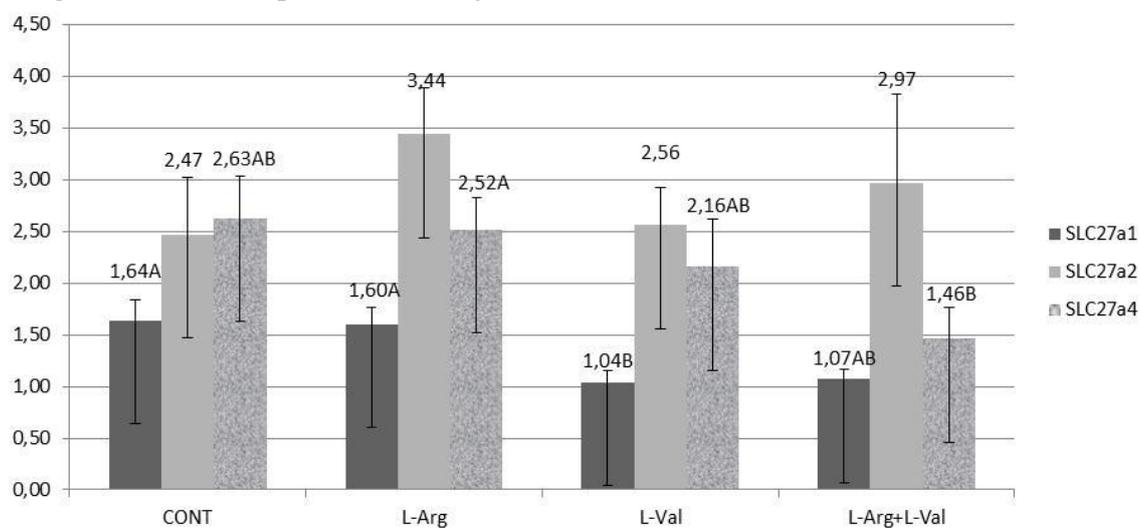
A suplementação com os aminoácidos L-Arg e L-Val influenciou a expressão dos genes transportadores de aminoácidos (FIGURA 2), sendo o gene *SLC7a7* menos expresso no tratamento com L-Val quando comparado ao tratamento Controle e L-Arg e, por sua vez, foi semelhante ao tratamento com L-Arg+L-Val. Já o gene *SLC7a9*, foi menos expresso no tratamento com L-Arg+L-Val do que nos tratamentos controle e com L-Arg, sendo porém semelhante ao tratamento com L-Val.

Figura 2 - Expressão de RNA mensageiro de genes que codificam transportadores de aminoácidos em tecido mamário de matrizes suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arginina e L-Valina quantificados por RT-qPCR. *SLC7a7*; *SLC7a9*. Valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Tukey  $P < 0,05$ .



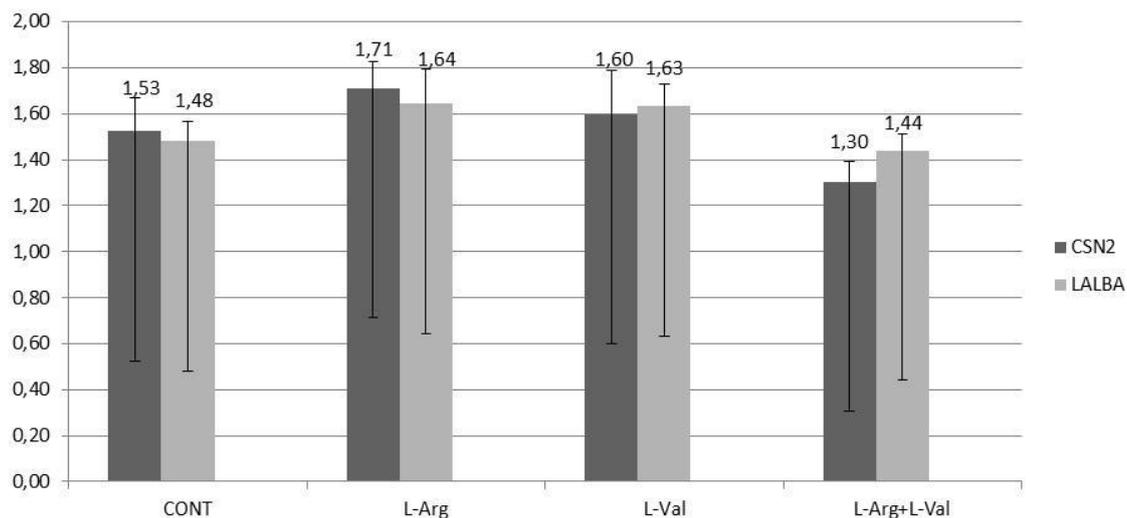
A expressão do gene transportador de ácidos graxos SLC27a1, quando comparado ao controle, foi menos expresso no tratamento com L-Val e, semelhante aos tratamentos com L-Arg e LArg+L-Val. A transcrição do RNAm do gene SLC27a4 foi semelhante ao controle nos tratamentos com L-Arg e L-Val, e menor no tratamento com L-Ag+L-Val, mas não diferiu dos demais tratamentos (FIGURA 3). Já o gene SLC27a2 não teve diferenças significativas quanto a sua expressão.

Figura 3 - Expressão de RNA mensageiro de genes que codificam transportadores de ácidos graxos em tecido mamário de matrizes suínas hiperprolifericas suplementadas com L-Arginina e L-Valina quantificados por RT-qPCR. SLC27a1; SLC27a2; SLC27a4. Valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste Tukey  $P < 0,05$ .



Os genes estudados da Caseína (CSN2) e Lactoalbumina (LALBA) que promove a síntese de lactose e aumentos associados ao volume do leite (FIGURA 4), não tiveram diferenças significativas quanto a sua expressão.

Figura 4 - Expressão de RNA mensageiro de genes que codificam proteínas do leite em tecido mamário de matrizes suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arginina e L-Valina quantificados por RT-qPCR. CSN2 (beta caseína); LABA (Alfa -Lactoalbumina).



### *Histologia e Imunohistoquímica*

A densidade alveolar, a área e o diâmetro do alvéolo do tecido glandular mamário (FIGURA 5) não apresentaram diferença com a suplementação de L-arginina e L-valina quando comparados ao tratamento controle (TABELA 3).

Figura 5 - Fotos histológicas de glândula mamária suína suplementada com AA funcionais (A) Controle, (B) L-Arginina, (C) L-Valina, (D) L-Arg+L-Val. As setas apontam para os alvéolos secretores. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina e o aumento utilizado foi de 100x.

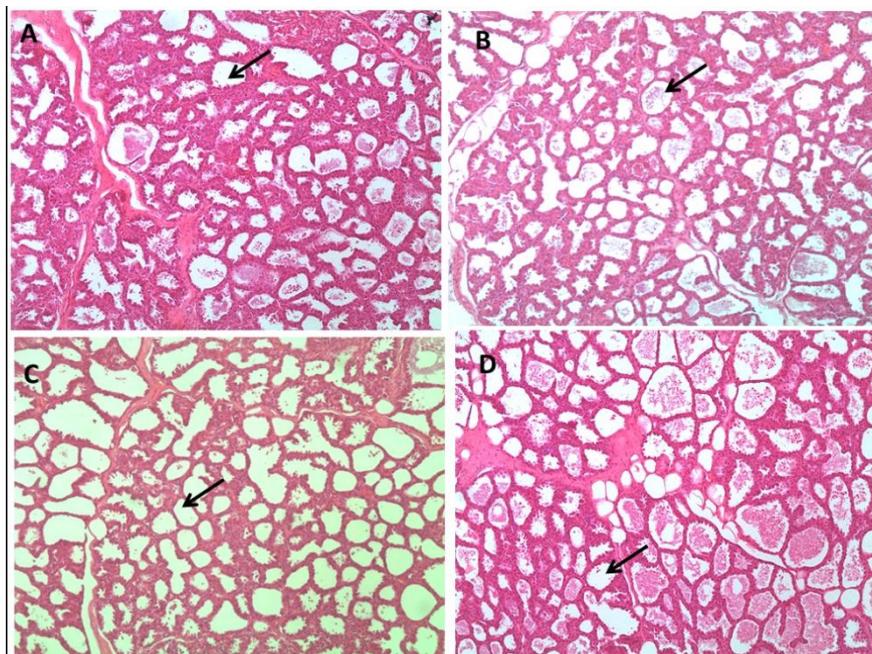


Tabela 3 - Média de densidade alveolar, diâmetro e área dos alvéolos de glândula mamária de matrizes suínas suplementadas com L-Arginina e L-Valina

	Tratamentos					CV (%)	P
	CONT	L-Arg	L-Val	L-Arg+L-Val			
Área mensurada ( $\mu^2$ )	4212	4210	4211	4210	0,07	0,202	
Densidade ( $mm^2$ )	6,44	6,45	5,90	5,89	34,12	0,120	
Diâmetro do alvéolo ( $\mu$ )	4,12	4,16	4,44	4,37	11,31	0,412	
Área do alvéolo ( $\mu^2$ )	11,70	9,63	15,07	12,78	36,13	0,062	

Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A associação dos aminoácidos L-Arg+L-Val resultou num aumento da proliferação celular (FIGURA 6) do tecido mamário das matrizes suplementadas quando comparadas as fêmeas do grupo controle (TABELA 4).

Figura 6 - Ensaio de imunohistoquímica de glândula mamária suína suplementada com aminoácidos funcionais (A) Controle, (B) L-Arginina, (C) L-Valina, (D) L-Arg+L-Val. As setas apontam para os alvéolos secretores marcados positivamente PCNA. As lâminas foram coradas com hematoxilina e o aumento utilizado foi de 400x.

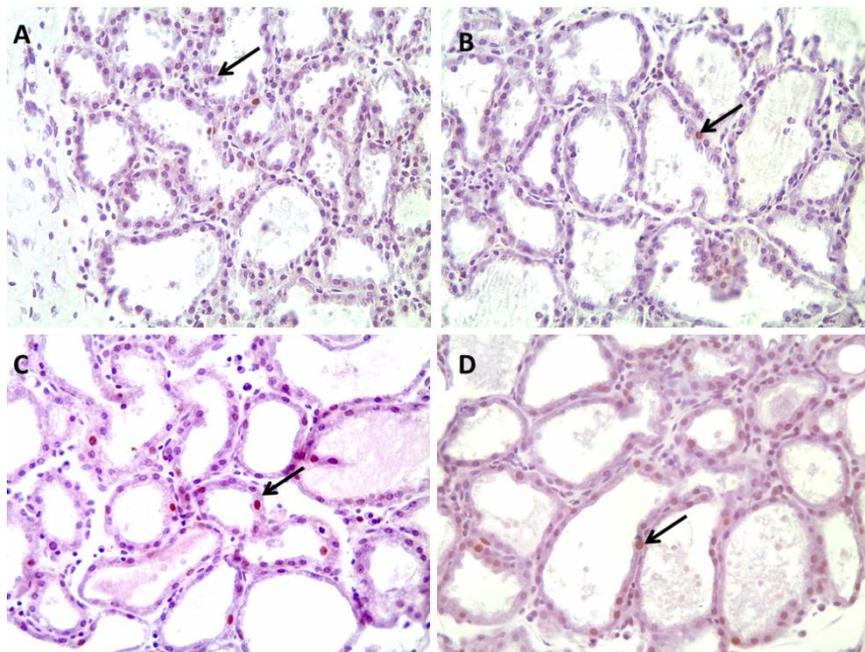


Tabela 4- Efeito da suplementação com L-Arginina e L-Valina sobre a proliferação de células alveolares de glândula mamária de matrizes suínas

	Tratamentos				CV (%)	P
	CONT	L-Arg	L-Val	L-Arg+L-Val		
Área mensurada ( $\mu^2$ )	4212	4210	4211	4210	0,07	0,2020
Total de células	708,03	501,09	530,49	596,78	102,32	0,0534
Cél. anti-PCNA	195,12	168,88	166,65	218,69	87,70	0,0882
Proliferação Celular*(%)	33,27 <sup>a</sup>	36,94 <sup>ab</sup>	33,87 <sup>ab</sup>	37,48 <sup>b</sup>	29,16	0,0094

\* Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma linha diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

#### IV. DISCUSSÃO

##### *Expressão Gênica*

O aumento da atividade da enzima BCATc está relacionada com as funções metabólicas das células epiteliais secretoras na glândula mamária lactante, para apoiar a síntese dos diferentes componentes do leite (TOVAR et al., 2001), enquanto a BCATm é expresso na maioria dos tecidos periféricos, exceto, o fígado (ZHOU et al. 2010). No

presente estudo, o tratamento suplementado com L-Arg apresentou maior expressão de BCATc do que o tratamento suplementado com L-Val e com a associação dos dois aminoácidos. Pode-se inferir que a arginina por ser precursora do óxido nítrico, favorece o aumento do fluxo sanguíneo mamário, que por sua vez proporciona o aumento da absorção de nutrientes e, conseqüentemente, têm-se mais substrato para atender a síntese láctea e com isso observa-se a maior expressão BCATc para suprir essa demanda. Além disso, estudos conduzidos anteriormente por Kroghet et al.(2017), observou-se que ao suplementar as matrizes suínas na lactação com arginina, os dois aminoácidos essenciais mais extraídos no pico de lactação foram a lisina (38%) e leucina (51%), enquanto a extração de valina foi em torno de 15%, o que explica o porque a BCATc aumentou a sua expressão no tratamento suplementado com Arg e não com L-Arg+L-Val, ou seja, a suplementação com L- Arginina leva a maior extração de Leucina, e mesmo com a suplementação de Valina, a Leucina permanece como o 1º AA limitante, indicando que pode ter ocorrido um desbalanço entre os AAs de cadeia ramificada.

O gene transportador SLC7A7 ( $y^+LAT$ ) medeia a absorção basolateral de aminoácidos nas células epiteliais mamárias, transportador  $Na^+$  independente, já o gene SLC7A9 ( $b^{0,+}AT$ ) medeia a absorção apical de aminoácidos básicos, especialmente lisina, arginina e cisteína, transportador  $Na^+$  dependente. O papel do gene SLC7A9 nas células mamárias suínas durante a lactação não é claro, mas acredita-se que atue na recuperação de AA catiônico livre do lúmen alveolar (WU; KNABE, 1994; MANJARIN et al., 2011). A eficiência do transporte de AA para a produção de leite aumenta a transcrição de genes que codificam os transportadores de Lisina em resposta à disponibilidade de AA na dieta (PÉREZ-LASPIUR et al., 2009). No presente estudo apenas o tratamento com L-Valina diferiu do tratamento controle, cujo gene SLC7A7 foi menos expresso, enquanto a expressão do gene SLC7A9 diferiu dos animais suplementados com L-Arg+L-Val em relação ao grupo controle, apresentando uma menor expressão gênica. Bequette et al. (1996), sugeriram que o desbalanço de BCAA absorvido pela glândula mamária diminuiria a eficiência da utilização de AA na proteína do leite. O que poderia afetar negativamente a eficiência do transporte de Lis e Arg para as células mamárias por meio de eventos competitivos em nível de transportador de AA (MANJARIN et al., 2011), justificando a ausência de resultados positivos quanto ao maior aporte desses aminoácidos adicionados a ração sobre a expressão dos transportadores de AA.

Os principais ácidos graxos presentes no triacilglicerídeos do leite da porca são os de cadeia longa com 16 a 22 átomos de carbono, e uma pequena quantidade de ácidos graxos de cadeia média, com 8 a 14 átomos de carbono (YANTAO et al., 2015). No presente estudo observa-se que os genes transportadores de ácidos graxos de cadeia longa SLC27a1 e SLC27a4 apresentaram menor expressão gênica no grupo de matrizes suplementadas com L-Val e L-Arg+L-Val, respectivamente. Enquanto o gene SLC27a2 não foi influenciado pela suplementação com os AA. De acordo com Mateo et al., (2008), a arginina participa da ativação da enzima lipase lipoproteica que libera o glicerol e ácidos graxos dos triglicerídeos para a síntese de gordura no leite, no entanto o efeito da suplementação de Arg depende do estágio da lactação, nesse estudo ocorreu no 21º dia de lactação, ou seja, após o pico de lactação. Além disso, o desbalanço de BCAA na dieta podem prejudicar o metabolismo lipídico (ZHANG et al., 2017), pois regulam expressão de genes de oxidação de ácidos graxos (NISHIMURA et al., 2010) sendo assim, são necessários mais estudos que analisem o efeito da suplementação desses aminoácidos sobre o metabolismo lipídico.

Estudos anteriores mostraram que à medida que progride a lactação das matrizes suínas, a taxa de extração da maioria dos AA essenciais aumenta, a fim de apoiar a alta demanda para síntese de proteína do leite (TROTIER et al. al., 1997; NIELSEN et al., 2002). No entanto neste estudo, não houve influência de L-Arg e L-Val sobre a expressão gênica dos genes que codificam as proteínas CSN2 e LALBA.

A LALBA desempenha um papel importante na produção e na secreção da lactose e também pode ter outros papéis inespecíficos que podem afetar a integridade das membranas de gordura do leite (PARK; HAENLEIN, 2006). Manjarin et al., (2011), afirmaram que a expressão dos transportadores de AA catiônicos e neutros, b<sup>0,+</sup>AT e y<sup>+</sup>LAT1, em relação aos genes que codificam proteínas do leite CSN2 e LALBA na glândula mamária suína contribuem com uma fração muito pequena do nitrogênio total do leite (WU; KNABE, 1994), um aumento na transcrição de RNAm de b<sup>0,+</sup>AT não mudaria em relação aos genes de CSN2 e LALBA. Guan et al., (2002), afirmam que aumento da concentração de valina na dieta não aumenta a produção de proteína do leite, mas indica que a valina pode participar consideravelmente no metabolismo, incluindo síntese proteica mamária e, diminuindo o *turnover* da proteína mamária.

### ***Histologia e Imunohistoquímica***

A capacidade secretora da glândula mamária é influenciada pelo número de células secretoras, o tamanho e a disposição dos alvéolos que eles formam (KNIGHT, 2000; AKERS, 2002; LANG et al., 2012). O número de células e a quantidade de disponibilidade de nutrientes para essas células mamárias são pontos críticos e determinantes na produção de leite.

As porcas precisam de uma grande quantidade de AA para apoiar o crescimento do tecido mamário e a síntese do leite durante a lactação (KIM et al., 1999). No entanto, neste estudo, mesmo oferecendo maior aporte de AA, L-Arg e L-Val, durante a lactação, não foram observadas diferença em relação à densidade, o diâmetro e área do alvéolo glandular mamário entre as matrizes suplementadas e as do tratamento controle.

Pelo ensaio de imunohistoquímica, podemos identificar que as matrizes suplementadas com de L-Arg+L-Valina tiveram um maior percentual de células em proliferação quando comparados ao tratamento controle. Ao suplementar com L-Val, AA que atua sobre a síntese proteica, juntamente com Arginina, que é precursora das poliaminas e do óxido nítrico, fundamentais na angiogênese, vasodilatação e fluxo de sanguíneo (LACASSE et al., 1996), induziu-se a proliferação celular (CHANDRASEKHARAN et al., 2005) no tecido glandular mamário em lactação. Nas células epiteliais mamárias, os BCAA podem estimular seu crescimento e proliferação, além de melhorar a sua diferenciação funcional, diminuir a taxa de degradação de proteínas e aumentar a longevidade (BOYD et al., 1995; WOLTER et al., 2002; WU et al., 2004).

### **V. CONCLUSÃO**

A suplementação com a associação de L-Arginina e L-Valina durante a lactação promove o aumento na proliferação celular na glândula mamaria de matrizes suínas durante a lactação. Entretanto, não foram observados mudanças quanto a expressão dos genes transportadores de aminoácidos, ácidos graxos e proteínas do leite na glândula mamária durante a lactação.

Nossos resultados sugerem que pode ter havido um desequilíbrio entre os aminoácidos de cadeia ramificada em decorrência da suplementação associada de L-Arginina com L-Valina, afetando por sua vez a regulação dos genes que modulam a síntese lipídica e proteica do leite na glândula mamária suína.

## REFERÊNCIAS

AKERS RM. **Lactation and the mammary gland**. Ames: Iowa State University Press; 2002.

Bancroft, J.D. & Gamble, M. **Theory and Practice of Histological Techniques** (Churchill Livingstone, 2008).

BEQUETTE BJ, METCALF JA, WRAY-CAHEN D, BACKWELL FR, et al. (1996) Leucine and protein metabolism in the lactating dairy cow mammary gland: responses to supplemental dietary crude protein intake. **J Dairy Res** 63:209–222

BOYD DR, KENSINGER RS, HARRELL RJ, BAUMAN DE. Nutrient uptake and endocrine regulation of milk synthesis by mammary tissue of lactating sows. **J AnimSci**. 1995;73:36–56.

CHANDRASEKHARAN, S.; FOLEY, N. A; JANIA, L.; CLARK, P.; AUDOLY, L. P.; KOLLER, B. H., 2005: Coupling of COX-1 to mPGES1 for prostaglandin E2 biosynthesis in the murine mammary gland. **Journal of Lipid Research**, 46, 2636–2648

CONWAY, M. E.; HUTSON, S. M Mammalian branched-chain aminotransferases. **Methods in Enzymology**. Jan 2000, 324:355-365.

INMAN JL, ROBERTSON C, MOTT JD, BISSELL MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**.2015;142:1028–42.

JI, F.; WU, G.; BLANTON, J.R. Jr.; 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.

KIM SW, HURLEY WL, HAN IK, EASTER RA. Changes in tissue composition associated with mammary gland growth during lactation in sows. **J Anim Sci**. 1999;77:2510–6.

KIM, S. W.; BAKER, D. H. AND EASTER, R. A. 2001. Dynamic ideal protein and limiting amino acids for lactating sow: The impact of amino acid mobilization. **Journal of Animal Science** 79:2356-2366.

KNIGHT, CH; PEAKER, M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion – **Experimental Physiology**, 1984 - Wiley Online Library

- KROGH, U.; OKSBJERG, N.; STORM, A. C. et al. Mammary nutrient uptake in multiparous sows fed supplementary arginine during gestation and lactation. **J. Anim. Sci.** 2017;95:2517–2532. doi:10.2527/jas2016.1291
- LACASSE P, FARR VC, DAVIS SR, PROSSER CG (1996) Local secretion of nitric oxide and the control of mammary blood flow. **J Dairy Sci** 79:1369–1374.
- LANG, S. L. C.; IVERSON, S. J.; BOWEN, W. D. Primiparous and multiparous females differ in mammary gland alveolar development: implications for milk production. **The Journal of Experimental Biology** 215, 2904-2911. 2012. doi:10.1242/jeb.067058
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D., 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods.**,25, 402–408.
- MANJARÍN R, STEIBEL JP, ZAMORA V et al (2011) Transcript abundance of amino acid transporters,  $\beta$ -casein and  $\alpha$ -lactalbumin in mammary tissue of peri-parturient, lactating and post-weaned sows. **J Dairy Sci** 94(7):3467–3476.
- MATEO RD, WU G, MOON HK, CARROLL JA, KIM SW. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. **J Anim Sci.** 2008;86:827–35.
- MOSER S, TOKACH M, DRITZ S, GOODBAND R, NELSEN J, LOUGHMILLER J. The effects of branched-chain amino acids on sow and litter performance. **J Anim Sci.** 2000;78:658–67.
- NIELSEN TT, TROTTIER NL, STEIN HH, BELLAVAR C, EASTER RA (2002) The effect of litter size and day of lactation on amino acid uptake by the porcine mammary glands. **J Anim. Sci** 80(9):2402–2411.
- NISHIMURA J, MASAKI T, ARAKAWA M, SEIKE M, YOSHIMATSU H. Isoleucine prevents the accumulation of tissue triglycerides and upregulates the expression of PPAR $\alpha$  and uncoupling protein in diet-induced obese mice. **J. Nutr.** 2010;140:496–500.
- O'QUINN PR, KNABE DA, WU G. Arginine catabolism in lactating porcine mammary tissue. **J Anim Sci.** 2002;80:467–74.
- PARK YW, HAENLEIN GFW. Handbook of milk of non-bovine mammals. **Oxford: Blackwell Publishing**; 2006.
- PÉREZ-LASPIUR JP, BURTON JL, WEBER PSD et al (2009) Dietary protein intake and stage of lactation differentially modulate AA transporter mRNA abundance in porcine mammary tissue. **J Nutr** 139:1677–1684
- PFAFFL, M. W., 2004: Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin, S. A. (ed.), *AZ of Quantitative PCR*. **International University Line**, La Jolla, CA, pp. 87–112.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P., 2004: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and

sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**,26, 509–515

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T. ; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3 ed. Viçosa, UFV, 252p. 2011.

STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M., 2009: A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**,94, 146–152.

TOVAR, A. R.; BECERRIL, E.; HERNA, H. et al. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. **J Physio Endocrinol Metab**. 280: E480–E488, 2001.

TROTTIER NL, SHIPLEY CF, EASTER RA. Plasma amino acid uptake by the mammary gland of the lactating sow. **J Anim Sci**. 1997;75:1266–78.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE; POPPE, B.; ROY, N. VAN; PAEPE, A. De, 2002: **Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**, 1–12.

WOLTER BF, ELLIS M, CORRIGAN BP, DEDECKER JM. O efeito do peso ao nascer e o complemento de leite suplementar alimentar aos leitões durante a lactação no pré-espelho e no desempenho do crescimento pós-desmame e nas características da carcaça. **J Anim Sci**. 2002; 80 : 301-8.

WU G, KNABE DA. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrums and milk. **J Nutr**. 1994;124:415–24.

Wu, G. **Amino Acids** (2009) 37: 1. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

WU, G; MORRIS, S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, London, v.336, n.11, p.1-17, Nov. 1998

YANTAO LV; GUAN,W; QIAO, H. et al. Veterinary Medicine and Omics (Veterinomics): Metabolic Transition of Milk Triacylglycerol Synthesis in Sows from Late Pregnancy to Lactation. OMICS A. **Journal of Integrative Biology** Volume 19, Number 10, 2015. DOI: 10.1089/omi.2015.0102.

ZHANG, S; ZENG, X; REN, M.; MAO, X; et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology** (2017) 8:10.DOI 10.1186/s40104-016-0139.

ZHOU Y, JETTON TL, GOSHORN S, LYNCH CJ, SHE P (2010) Transamination is required for alpha-ketoisocaproate but not leucine to stimulate insulin secretion. **J Biol Chem** 285(44):33718–33726.

**ANEXO**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO  
 CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: [ceuap@ufv.br](mailto:ceuap@ufv.br) – site: [www.ceuap.ufv.br](http://www.ceuap.ufv.br)

Viçosa, 18/09/15

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Arginina e valina na nutrição de matrizes suínas hiperprolíficas**", protocolo nº **053/2015**, sob a responsabilidade de **Alysson Saraiva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **18/Set/2015**.

Vigência do Projeto: de **01/10/2015** a **31/12/2015**

Espécie/linhagem: **Suínos** Nº de animais: **20**

Peso: **270Kg** Idade: **18 meses** Sexo: **Fêmea** Origem: **Setor de Suinocultura**

## CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Arginine and valine in the nutrition of hyper-prolific sows**" protocol nº **053/2015**, under the responsibility of **Alysson Saraiva** - which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Sep, 18th, 2015**.

Duration of the Project: from **Oct, 01st, 2015** to **Dec, 31th, 2015**.

Species / strain: **Swine** Nº of animals: **20**

Weight: **270Kg** Age: **18 months** Sex: **Female** Source: **Setor de Suinocultura**

Márcio Luiz Chizzotti  
 Coordenador da CEUAP/UFV

## **ARTIGO 2- DESEMPENHO DE MATRIZES SUÍNAS HIPERPROLÍFICAS SUPLEMENTADAS COM L-ARGININA E L-VALINA NO TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO**

### **I. INTRODUÇÃO**

Com os avanços genéticos na suinocultura, as matrizes suínas presentes no mercado, conhecidas como hiperprolíficas, são altamente produtivas com grande número de leitões nascidos por leitegada, no entanto, alguns pontos inerentes a esses avanços têm sido preocupantes, devido ao seu impacto econômico na produção suinícola.

O peso ao nascer está diretamente relacionado a um importante fator, a desuniformidade da leitegada aliada a alta variabilidade de peso, ocasionada pela capacidade uterina reduzida (BÉRARD et al., 2010) e restrição do crescimento intrauterino (DHAKAL et al., 2013), além das falhas na nutrição materno-fetal.

A suplementação com aminoácidos funcionais no período gestacional e lactacional, tem sido utilizada como estratégia, devido à alta demanda de nutrientes para o desenvolvimento fetal e produção de leite, que é diretamente influenciada pela nutrição da fêmea neste período. Dentre os aminoácidos funcionais, destaca-se a arginina e a valina.

A arginina é uma importante precursora nas sínteses de ureia, citrulina, creatina, poliaminas, ornitina, prolina, agmatina e óxido nítrico, além da síntese estrutural de proteínas (WU et al., 1997; WU; MORRIS, 1998); MATSUNAGA et al., 2002)

Diversos autores (MATEO et al., 2007; MATEO et al., 2008; LIMA, 2010; CUI et al., 2017) já avaliaram os efeitos de dietas suplementadas com arginina em matrizes suínas desde a gestação até o desmame e, conseguiram observar benefícios dessa suplementação ao final da lactação tanto no desempenho da leitegada quanto para a condição corporal das fêmeas. Além do mais, a arginina tem a capacidade de estimular a secreção de prolactina e hormônio do crescimento, importantes para o desenvolvimento da glândula mamária suína (REYES; KARL; KLAHR, 1994), estando diretamente correlacionado com a capacidade de produção de leite. A relação produção de leite e/ou concentração de nutrientes no leite está intimamente ligada ao ganho de peso dos leitões (NOBLET; ETIENNE, 1987; KING et al, 1993; FARMER et al., 2010), dessa forma essa suplementação torna-se marginalmente rentável dentro do contexto da produção suinícola.

A valina é um aminoácido de cadeia ramificada, assim como a leucina e a isoleucina, esses aminoácidos desempenham um papel chave na regulação do turnover das proteínas musculares (JURASINSKI et al., 1995) . As fêmeas suínas em lactação possuem alta exigência de aminoácidos de cadeia ramificada (WANG et al., 2008), para sustentar a produção de leite (KIM et al., 2009). A captação destes aminoácidos pela glândula mamária (76 g/d do dia 13-20 de lactação) é muito maior do que a sua secreção na proteína do leite (46 g/d) (TROTIER et al., 1997). Desse modo, a glândula mamária suína lactante possivelmente cataboliza 30 g BCAA/d (40% do BCAA retirado do plasma arterial).

A valina nas rações à base de milho e farelo de soja para porcas em lactação, está entre os três aminoácidos mais limitantes em uma dieta calculada a partir do National Research Council (NRC, 2012) que em ordem decrescente são: lisina, valina e treonina. Segundo Kim e Easter (2001), essa ordem de limitação permanece inalterada, independentemente da taxa de mobilização do tecido corporal da porca. No entanto, ao analisar diversos estudos conduzidos (RICHERT et al., 1996; 1997a b; GAINES et al., 2006; CARTER et al., 2000; DEVI et al., 2015; CRAIG et al., 2016; Xu et al., 2017), observa-se uma grande discrepância entre os resultados de desempenho, visto que a relação Valina:Lisina varia muito entre os estudos.

Com o intuito de compensar as deficiências do ambiente uterino no terço final de gestação e aumentar o aporte de nutrientes para a síntese de leite na lactação, objetivou-se com esse estudo combinar a suplementação de arginina e valina e, avaliar o desempenho das matrizes e suas respectivas leitegadas ao desmame.

## **II. MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos descritos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (protocolo número 013/14).

O experimento foi conduzido em uma granja comercial localizada no município de Oliveira – MG, sendo utilizadas 23 fêmeas suínas da mesma linhagem híbrida hiperprolífica por tratamento. As matrizes foram selecionadas a partir do histórico reprodutivo de 12 a 13 leitões nascidos/parto e registros de manejo de cobertura semelhantes, sendo inseminadas artificialmente por um mesmo grupo de machos de fertilidade comprovada por meio de completa avaliação andrológica.

As matrizes suínas foram alojadas em galpão de gestação em gaiolas individuais contendo um bebedouro tipo chupeta e comedouro tipo calha. Aos 108 dias de gestação as matrizes foram transferidas para o setor de maternidade.

As baias de maternidade continham um bebedouro tipo chupeta adequado para a matriz e outro para os leitões, comedouro de concreto para as matrizes, piso 2/3 ripado e escamoteador como fonte de calor para leitões.

A suplementação dos aminoácidos iniciou aos 85 dias de gestação e foi até desmame, sendo feita na forma *on top*, ou seja, os aminoácidos eram colocados nos *drops* do alimentador e adicionados à ração no momento do fornecimento às matrizes suínas. O manejo alimentar era o adotado na granja, na gestação era feito uma vez ao dia, sendo 2,4 Kg de ração dos 85 dias de gestação até o parto. Na lactação, a suplementação dos aminoácidos nos primeiros quatro dias, foi de 4,0 Kg de ração, sendo dividida em dois arraçoamentos, e do quinto dia de lactação ao desmame 7,0 Kg de ração, em três arraçoamentos. As sobras diárias foram pesadas para estimar o consumo de ração durante a lactação. Para a pesagem da ração foi utilizada balança eletrônica Filizola MF 6®, com capacidade de 6,0 kg e precisão de 0,001 kg. A L-Arginina e a L-Valina foram previamente pesadas em balança eletrônica Marte AW220, com capacidade de 220g e precisão de 0,0001g, e foi identificada de acordo com o tratamento no Laboratório Central de Pesquisa Animal da UFLA. A ração de gestação e lactação (TABELA 1) e o manejo alimentar utilizados foram os mesmos adotados pela granja. A água foi fornecida à vontade durante todo o período experimental.

Todas as matrizes foram pesadas na entrada da maternidade (108 d de gestação) e ao desmame, apenas 12 matrizes por tratamento foram pesadas após 48h após o parto e no 7º dia de lactação, a fim de mensurar a perda de peso em quilos e porcentagem. No 2º dia de lactação e um dia anterior ao desmame foram obtidas a espessura de toucinho e a profundidade de lombo das matrizes através do ultrassom, a partir de dois pontos de leitura, por meio do equipamento ALOKA modelo SSD-500 e transdutor linear de 3,5MHz modelo UST 5011, segundo a metodologia de Souza (2011). A primeira medida tomada foi realizada a 6,5 cm da linha dorso-lombar e a 6,5 cm da última costela na direção caudal, obtendo-se neste ponto a profundidade de lombo no ponto P1; a segunda medida foi tomada a 6,5 cm da linha dorso-lombar e a 6,5 cm da última costela na direção cranial, obtendo-se neste ponto a profundidade de lombo no ponto P2, segundo metodologia de Rosa (2011).

A produção de leite das matrizes foi estimada a partir da equação sugerida por Noblet e Etienne (1989):

$$\text{produção de leite} \left( \frac{\text{kg}}{\text{dia}} \right) = \frac{[(0,718 \times \text{ganhodepesodiáriodoleitão}(g) - 4,9) \times \text{númerodeleitões}]}{0,19}$$

Tabela 1 - Composição e níveis nutricionais das rações de gestação e lactação, usadas no experimento.

INGREDIENTES	Gestação	Lactação
	%	%
Milho	64,19	55,34
Farelo de soja (45%)	17	25
Farelo de trigo	10	---
Açúcar	---	5
Óleo de soja	---	5,1
Fosfato bicálcico	1,02	1,54
Levedura de cana	1,25	2,5
Caulim	1,84	---
Sal comum	0,3	0,49
Calcário calcítico	0,78	0,61
Butirato de sódio	0,3	---
Cloreto de colina	0,12	0,07
Mycosorb	0,1	0,1
L-Lisina HCL (78%)	0,1	0,24
DL-Metionina (99%)	---	---
Núcleo SuperTech G <sup>1</sup>	3	---
Núcleo SuperTech L <sup>2</sup>	---	4
BHT	---	0,01
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	3080	3430
Proteína bruta %	15,7	18,67
Lisina digestível %	0,669	1,144
Metionina +Cistina digestível %	0,463	0,622
Treonina digestível %	0,603	0,724
Triptofano digestível %	0,164	0,219
Arginina digestível %	0,948	1,127
Cálcio %	0,752	0,836
Fósforo disponível%	0,431	0,44

<sup>1</sup> Quantidade por kg do produto: vit. A 225.000UI, vit. D3 37.500 UI, vit. E 1.500mg, vit. K 75mg, vit. B12 625mg, niacina 1.000mg, ácido pantotênico 500mg, ácido fólico 65mg, biotina 6,75mg, colina 8.400mg, piridoxina 100mg, riboflavina 150mg, tiamina 32,5mg; cobre 450mg, ferro 2.750mg, fósforo 85mg, flúor 850mg, iodo 17,5mg, manganês 1.250mg, selênio 7,5mg,

---

sódio 49mg, zinco 2.750mg, cromo 5mg, bacitracina de zinco 1.000mg.

<sup>2</sup> Quantidade por kg do produto: 9000 UI kg<sup>-1</sup> de retinol; 1500 UI kg<sup>-1</sup> de colecalciferol; 60 mg kg<sup>-1</sup> de dl- $\alpha$ -tocoferilacetato; 25 mg kg<sup>-1</sup> de vitamina B12; 40 mg kg<sup>-1</sup> 3 mg kg<sup>-1</sup> niacina; 20 mg kg<sup>-1</sup> de ácido pantotênico; 2,6 mg kg<sup>-1</sup> de ácido fólico; 0,27 mg kg<sup>-1</sup> de biotina; 336 mg kg<sup>-1</sup> colina; 4 mg kg<sup>-1</sup> de piridoxina; 6 mg kg<sup>-1</sup> de riboflavina; 1,3 mg kg<sup>-1</sup> de tiamina; 45 mg kg<sup>-1</sup> de cobre; 275 mg kg<sup>-1</sup> de ferro; 8,5 mg kg<sup>-1</sup> de fósforo; 85 mg kg<sup>-1</sup> de flúor; 1,75 mg kg<sup>-1</sup> de iodo; 125 mg kg<sup>-1</sup> de manganês; 0,75 mg kg<sup>-1</sup> de selênio; 4,9 mg kg<sup>-1</sup> de sódio; 275 mg kg<sup>-1</sup> de zinco; 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de cromo; 100 mg kg<sup>-1</sup> de bacitracina de zinco.

Nas primeiras 48 horas após o parto manejou-se os leitões de modo a manter com as matrizes somente o número de leitões de acordo com o número de tetos viáveis, sendo esses leitões assistidos de tal forma que lhes fossem garantidas as primeiras mamadas do colostro.

Através dos pesos individuais de todos os leitões ao nascimento em cada leitegada, foi realizada a estratificação do peso, em sete estratos (dados em porcentagem) sendo o 1º estrato - menor ou igual a 800; 2º - entre 801 e 1000; 3º - entre 1001 e 1200; 4º - entre 1201 e 1400; 5º - 1401 a 1600; 6º - entre 1601 a 1800 e 7º - maior que 1800 gramas. Os critérios para a utilização desses estratos foram baseados no estudo de Bérard et al. (2010), que afirmaram que leitões com peso inferior a 800 g são considerados com crescimento intra-uterino retardado, e segundo pesquisas anteriores de Pettigrew et al. (1986), Roehe e Kalm (2000) e Quiniou et al. (2002), a probabilidade de sobrevivência pré-desmame é reduzida (abaixo de 75%) para leitões com peso inferior a 1000 gramas e ultrapassa 95% para leitões com peso superior a 1800 gramas.

No 2º e 14º dia de lactação as leitegadas foram pesadas ao nascimento, e um dia antes do desmame, para mensurar o ganho de peso dos leitões.

Após o desmame, os leitões foram transferidos para as salas de creche e as matrizes receberam o mesmo manejo empregado às demais matrizes do plantel.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos: 1) ração de gestação/lactação sem suplementação de aminoácidos industriais (CON); 2) ração CON suplementada com 1% de L-Arginina (L-Arg); 3) ração CON suplementada com 120% de L-Valina referente ao nível de lisina (L-Val) e 4) associação dos tratamentos 2 e 3 (L-Arg+L-Val). Foram utilizadas 23 matrizes por tratamento, que foram distribuídas procurando-se manter a condição corporal (peso corporal, espessura de toucinho e profundidade de lombo) mais semelhante possível. A matriz suína e sua respectiva leitegada foram consideradas a unidade experimental.

### *Análises sanguíneas*

As concentrações plasmáticas de creatinina, ureia e proteínas totais foram determinadas por meio de coletas de sangue nas matrizes suínas ao 7º dia de lactação. A coleta de sangue foi realizada na veia jugular e o sangue acondicionado em tubos de 4 mL estéreis a vácuo com anticoagulante (K3EDTA) (Labor Import, Brasil). As amostras foram transportadas em caixa térmica com gelo até o laboratório da granja, onde foram centrifugadas a 2.000 rpm por 15 minutos, para obtenção do plasma sanguíneo. Em seguida, o plasma foi armazenado a -20 °C para posteriores análises. As análises foram realizadas em laboratório comercial sendo a análise de creatinina pelo método cinético, a uréia pelo método enzimático ultra violeta e as proteínas plasmáticas totais pelo método biureto.

### *Estatística*

Todas as variáveis mensuradas foram testadas quanto à normalidade antes da análise de variância. As variáveis que não seguiam uma distribuição normal foram transformadas através do procedimento PROC RANK do SAS. A análise de variância foi realizada através do procedimento PROC MIXED do SAS (9.3) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%.

## **III. RESULTADOS**

### *Condição corporal das matrizes e desempenho da leitegada ao nascimento*

A suplementação da ração com L-Arginina e L- Valina no terço final da gestação e durante a lactação não influenciou ( $P>0,05$ ) o consumo de ração médio diário, as variáveis de condição corporal e a produção de leite (Tabela 2).

Tabela 2 - Desempenho das matrizes suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arg e L-Val a partir de 85 dias de gestação e durante a lactação

Variáveis	Tratamentos				
	COM	L-Arg	Val	Arg+Val	CV (%)

Matrizes (n)	23	23	23	23		
Consumo de ração (g)	6295,7	6290,3	6195,4	6240,8	21,4	0,42
Peso da Matriz (kg)						
48h pós-parto	245,00	252,17	246,20	241,67	9,74	0,939
Desmame	238,80	244,67	223,00	225,33	9,40	0,364
Perda peso porca (kg)	6,20	7,50	23,20	16,33	119,02	0,148
Perda peso porca (%)	2,14	2,68	9,34	6,74	124,60	0,061
Profundidade de Lombo (mm)						
P1 48h pós-parto	50,41	47,4	51,14	42,83	18,7	0,110
P1 Desmame	53,41	57,24	56,04	58,16	15,4	0,420
P2 48h pós-parto*	46,91ab	44,95b	50,32 <sup>a</sup>	42,98b	16,8	0,020
P2 Desmame	49,21	55,75	53,64	51,19	18,0	0,352
Produção de leite (Kg/dia)	8,93	8,74	8,95	9,51	19,6	0,701

\* Diferenças significativas pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). P1 (Ponto P1); P2(Ponto 2).

O número total de leitões nascidos do tratamento controle foi maior, ou seja, nasceram 2,93 leitões a mais do que o tratamento com L-Val. O peso total da leitegada de leitões nascidos foi maior no tratamento controle em relação aos tratamentos com L-Val e L-Arg+L-Val. Em relação aos leitões nascidos vivos, o número e os seus pesos individuais e de suas leitegadas não foram influenciados pela suplementação com L-Arginina e L-Valina. Da mesma forma, o número e o percentual de mumificados e natimortos não foram influenciados pela suplementação com esses aminoácidos.

Tabela 3 – Desempenho de leitegadas oriundas de fêmeas suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arg e L-Val a partir de 85 dias de gestação

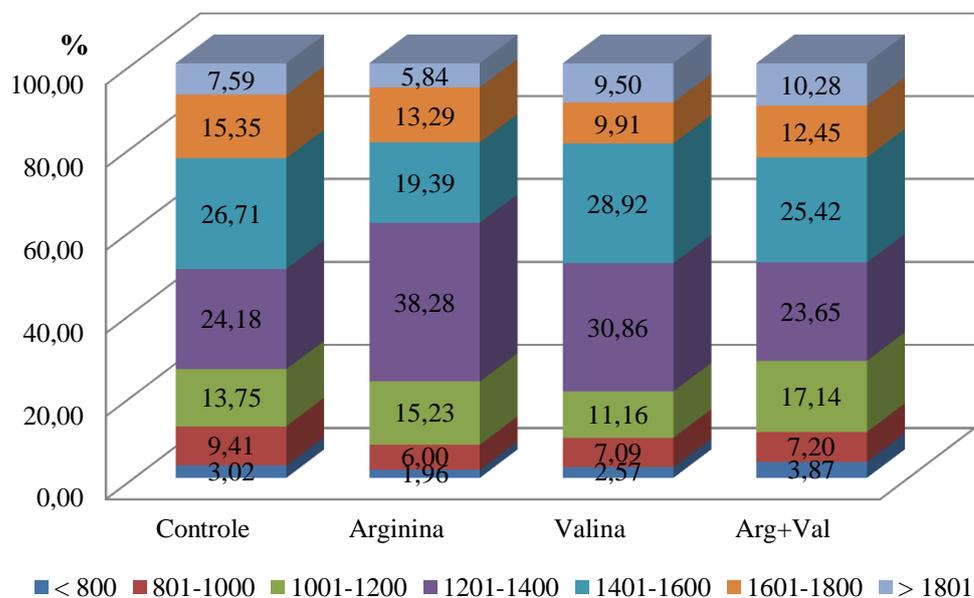
Variáveis	Tratamentos				CV (%)	P
	CON	L-Arg	Val	Arg+Val		
Número de leitões						
NT	19,00a	17,43ab	16,07b	17,00ab	13,40	0,005
NV	17,33	16,43	15,71	16,00	12,83	0,150
Peso leitegada (Kg)						
NT	25,92a	25,51ab	22,42b	23,06b	14,42	0,005
NV	23,91	22,35	21,81	22,09	13,61	0,257
Peso leitões (g)						
NT	1368,09	1349,51	1389,97	1374,64	8,64	0,846
NV	1381,91	1361,38	1394,27	1385,09	8,38	0,901
Mumificados	0,33	0,50	0,29	0,38	172,91	0,947

Mumificados (%)	1,78	3,18	1,74	2,40	184,85	0,954
Natimortos	1,13	0,86	1,57	0,85	116,41	0,462
Natimortos (%)	6,69	5,57	10,21	4,99	118,86	0,472

Letras distintas na linha diferem pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). NT- Nascidos Totais; NV- Nascidos Vivos.

Não houve diferença entre os estratos dos pesos de todos os leitões nascidos (FIGURA 1) oriundos de fêmeas suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arg e L-Val a partir de 85 dias de gestação ( $P>0,05$ ).

Figura 1 – Estratificação do peso do total de leitões nascidos oriundos de matrizes suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arg e L-Val a partir de 85 dias de gestação



### *Período Lactacional*

Não houve influência ( $P>0,05$ ) da suplementação com os aminoácidos L-Arg e L-Val sobre o número médio de leitões/fêmea, peso total da leitegada e peso médio dos leitões aos 14 dias e ao desmame. Não houve efeito da suplementação dos aminoácidos sobre o ganho de peso da leitegada e ganho de peso médio diário dos leitões (TABELA 4).

Tabela 4 - Desempenho de leitegadas de fêmeas suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arg e L-Val a partir de 85 dias de gestação e durante a lactação

Variáveis	Tratamentos				CV (%)	p
	CON	L-Arg	Val	Arg+Val		
Nº de leitões 48h*	13,67	13,64	13,57	13,58		
Desmame	13,27	13,00	12,79	13,08	10,12	0,576
Peso leitegada (Kg)						
14 dias	57,33	57,72	58,53	55,21	14,81	0,783
Desmame	72,76	71,73	73,23	71,93	14,93	0,983
GPD	2429,62	2343,62	2395,97	2526,89	20,84	0,835
Peso leitões (g)						
14 dias	4327,54	4295,24	4431,37	4220,72	11,62	0,755
Desmame	5464,36	5540,34	5752,89	5500,38	12,19	0,686
GPD	184,22	185,07	192,82	200,00	16,32	0,545

\* Número de leitões na equalização até 48 h pós-parto; GPD- Ganho de peso médio diário.

#### *Parâmetros sanguíneos*

Não houve efeito da suplementação com L-Arg e L-Val (TABELA 5) sobre concentrações de uréia, creatinina e proteínas plasmática totais ( $P > 0,05$ ).

Tabela 5 - Parâmetros sanguíneos de fêmeas suínas hiperprolíficas suplementadas com L-Arg e L-Val a partir de 85 dias de gestação e durante a lactação

Variáveis	Tratamentos				CV(%)	P
	CON	L-Arg	Val	Arg+Val		
Uréia mg/dl	35,45	39,82	38,33	39,70	19,95	0,3942
Creatinina mg/dl	2,29	1,90	1,96	1,96	14,51	0,9366
Proteínas totais g/dl	8,32	7,98	7,94	7,88	7,49	0,8913

#### **IV. DISCUSSÃO**

A ingestão de ração está diretamente ligada à produção de leite e, conseqüentemente, ao desempenho dos leitões, assim a adequada nutrição torna-se um grande desafio, principalmente porque com a progressão da lactação, a produção de leite aumenta e, o impacto do aumento no consumo alimentar torna-se mais importante. Neste estudo, a quantidade média de ração fornecida às matrizes de todos os tratamentos foram cerca de 6250g, não houve restrição alimentar, e não foram observadas diferenças

entre os tratamentos sobre o consumo de ração. Resultados semelhantes ao nosso estudo foram encontrados por outros pesquisadores que utilizaram 1% de L-Arg, como Mateo et al. (2007), que suplementaram a ração de lactação para matrizes primíparas, não observaram efeitos da suplementação em relação ao consumo voluntário, cujo consumo médio foi de 6000 g/dia<sup>-1</sup> durante 21 dias de lactação. Lemes (2016), também não observou influência da L-Arg sobre o consumo de ração, cuja média de todos os tratamentos foi de 4697g de ração.

Os níveis de suplementação com L-Val divergem entre os trabalhos, mas resultados semelhantes de consumo de ração foram encontrados por Devi e Kim, (2015), que avaliaram o desempenho de matrizes primíparas suplementadas com 0,80 e 0,85 de L-Val:L-Lis, e o consumo médio diário de ração não foi afetado pelos diferentes níveis dietéticos. Já Strathe et al. (2016), ao analisarem o efeito da suplementação de L-Val com seis níveis diferentes, 0,84, 0,86, 0,88, 0,90, 0,95 e 0,99%, não encontraram diferença entre os tratamentos sobre consumo médio de ração das matrizes.

Em contradição aos nossos resultados Craig et al. (2016), trabalharam com a suplementação de L-Val com 2 níveis, "Normal" (0,68%) e "Alto" (1,10%), e o consumo médio diário de ração foi significativamente diferente entre o grupo controle (7100 g) e os grupos de tratamento (7700 g), essa diferença de consumo entre os tratamentos, eles atribuíram ao maior nível de fibra na dieta de controle em comparação com as dietas de tratamento (3600 vs 2600 g/kg FB), que devido ao volume das fibras demoram mais para serem consumidas e dão saciedade (RAMONET et al., 1999; BENELAM, 2009).

A condição corporal das matrizes foi semelhante no momento da distribuição entre os tratamentos, e a perda de peso não ultrapassou o limite de mobilização corporal adequado para matrizes em lactação, ou seja, menos que 10,0% do seu peso das 48h pós-parto até o desmame, ou seja, o desempenho da leitegada deve-se principalmente à dieta.

A perda de peso das matrizes suínas durante a lactação é esperada (BOYD et al., 2000), e não é viável economicamente zerar essa mobilização, o que é preocupante, é o percentual de perda que possa vir a comprometer o desempenho reprodutivo subsequente.

Schenkel et al. (2010), destacaram que matrizes suínas múltíparas podem perder até 10,0% e primíparas até 8,0% de seu peso corporal na lactação, sem causar prejuízos a sua vida reprodutiva. Isso porque, fêmeas hiperprolíficas têm maior percentual de tecido

magro, como consequência, menor reservas de gorduras e baixa capacidade de ingestão de alimentos, diante da alta exigência nutricional da fase de lactação pode levar a uma elevada perda de peso (LIMA, 2008).

Alguns estudos utilizando a suplementação com L-Val em diferentes níveis estão de acordo com os resultados deste estudo, como os de Richert et al. (1997), que suplementaram matrizes suínas com três níveis de L-Val:L-Lis, 80, 100, e 120% e, não encontraram efeito da suplementação sobre a perda de peso entre as matrizes que desmamaram mais de 10 leitões e, nem sobre as matrizes que desmamaram menos de 10 leitões. Devi e Kim (2015), aumentaram as concentrações de valina através do aumento do farelo de soja, de 0,80% para 0,85% a fim de avaliar o desempenho de primíparas na lactação que amamentam leitegadas numerosas, e verificaram que não houve diferença em relação ao peso corporal das matrizes após o parto e nem ao desmame. Craig et al (2016), encontraram que as matrizes alimentadas com as dietas contendo 110% L-Val:L-Lis perderam mais gordura no ponto P2 do que as matrizes alimentadas com as dietas nível normal de L-Val. A ausência do efeito da suplementação com L-Arg sobre a condição corporal das matrizes foi demonstrada por Moreira (2014), que utilizou os níveis de 0,5; 1,0 e 1,5% de L-Arginina na ração de matrizes suínas multíparas lactantes e, também não encontraram diferença nas variáveis de condição corporal.

No presente estudo, a média dos tratamentos dos nascidos vivos de 16,37 leitões, está acima da média das granjas com plantel acima de 3000 matrizes em produção, cuja média está entre 12,66 e 14,35 leitões nascidos vivos por parto com alto padrão tecnológico, (AGRINESS, 2016). O menor número do total de leitões nascidos das matrizes suplementadas com L- Val, não pode ser atribuído à suplementação com o aminoácido que se iniciou aos 85 dias de gestação, pois o número de leitões já havia sido definido, por volta do 35º dia de gestação (PANZARDI et al., 2007), tendo em vista que já havia vida fetal, pois a placentação, a organogênese e a formação do esqueleto já podiam ser observados. Estudos conduzidos cuja suplementação com L-Arg iniciou-se no terço final da gestação encontraram resultados semelhantes a este estudo, como Lima (2010), que estudou o fornecimento de arginina dos 90 aos 110 dias de gestação, com a suplementação de diferentes níveis de arginina (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5%), e o número médio de nascidos foi superior a 15 leitões nascidos totais. Não houve diferença para o número de leitões nascidos vivos, pesos da leitegada total ou peso médio dos vivos. Do mesmo modo, Bass et al. (2011) suplementaram arginina nas

três últimas semanas de gestação e, não houve efeito no número de nascidos vivos, peso ao nascer.

Os benefícios da suplementação com L-Arg nas fases iniciais da gestação de matrizes suínas foram descritos por Gao et al., (2012) e Mateo et al., (2007), que utilizaram a suplementação de 1% de arginina dos 30 aos 114 dias e dos 22 aos 114 dias de gestação, respectivamente, e observaram um aumento no número de nascidos vivos. Che et al. (2013), utilizaram 1% de arginina em dois momentos diferentes de suplementação do 30º ao 90º dia de gestação e 20º ao 114º dia de gestação. E o grupo que recebeu Arg até 114º dias teve desempenho superior, indicando vantagens de estender o uso até o parto.

Fonseca (2016) observou que o fornecimento de L-arginina para matrizes suínas em gestação dos 30 aos 60 dias de gestação e dos 80 dias de gestação ao parto (114 dias) não alterou o número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, assim como não influenciou o peso dos leitões nascidos totais e o coeficiente de variação do peso dos nascidos, já o peso médio dos leitões nascidos vivos foi influenciado positivamente pela suplementação com L-arginina, aumentando em 8,09% o peso em relação ao grupo controle.

O tempo de suplementação de 23 dias e somente no terço final da gestação, pode ter sido insuficiente para encontrarmos efeitos da suplementação sobre o desempenho da leitegada e condição corporal das fêmeas. Segundo Kim et al., (2009), o retardo do crescimento fetal ocorre principalmente a partir do 60º dia da gestação, justificando os benefícios da suplementação com L-Arg nas fases iniciais da gestação identificados em diversos estudos.

A estratificação do peso ao nascimento permite que seja analisada a uniformidade e a variabilidade de peso entre os leitões, podendo ser facilmente identificada às classes de peso que são moduladas com a suplementação dos aminoácidos. Neste estudo não foram observados efeito da suplementação com aminoácidos sobre o estrato dos pesos dos pesos ao nascimento. No entanto, Fonseca (2016), observou que o percentual de leitões nascidos com peso acima de 1810 g foi maior ( $P < 0,05$ ) em matrizes suínas suplementadas com L-arginina (14,7%) do que em relação aos leitões provenientes das matrizes que não receberam suplementação (6,3%), entretanto, nas demais categorias de peso não houve efeito ( $P > 0,05$ ). Bass et al. (2017), por sua vez, estratificaram os pesos dos leitões ao nascimento em nove classes e, observaram que a frequência de leitões pesando 1000 a 1200 g diminui com a

suplementação 1% de L-Arg dos 93 aos 110 dias de gestação e, que a frequência de leitões com peso de 1600 a 1800 g no nascimento diminuiu, no entanto, esses autores interpretaram essa diferença aparente como uma ocorrência aleatória sem base biológica.

O número médio de mumificados e natimortos observados neste estudo está dentro do aceitável para o genótipo das matrizes hiperprolíficas. O manejo de assistência ao parto se mal executado, também pode aumentar o índice de natimortos, entretanto no sistema de manejo empregado na granja, esta função é executada por profissionais experientes. A suplementação com L-Arg e L-Val teve início aos 85 dias de gestação, e após 35º dia de gestação não ocorre mais o processo de mumificação dos fetos mortos, devido aos ossos que já estão formados e, impedem que a reabsorção ocorra, a partir daí os fetos são contabilizados ao nascimento como natimortos e mumificados (LIMA, 2010). Trabalhos anteriores que suplementaram as matrizes gestantes com 1% de L-Arg não encontraram efeito algum sobre o índice de mumificados e natimortos como Lima (2010) que iniciou a suplementação a partir de 90 dias de gestação. Assim como os autores que trabalharam com a suplementação nas fases iniciais como Dallanora (2014), suplementou dos 25 aos 112 de gestação e Fonseca (2016), suplementou dos 30 aos 60 dias e dos 80 aos 114 dias de gestação.

### ***Período lactacional***

Não houve influência da suplementação com os aminoácidos L-Arg e L-Val sobre o número médio de leitões/fêmea ou desempenho da leitegada aos 14 dias de lactação e ao desmame. O número de leitões inicialmente, 13 leitões por matriz, manteve-se até o desmame. O leite materno foi o único alimento consumido pelos animais e não foi encontrado nenhum efeito da suplementação desses AA sobre o ganho de peso da leitegada e ganho de peso médio diário dos leitões. Resultados semelhantes a este estudo foram observados por Moreira (2014), que trabalhou com múltiparas, e observou que os tratamentos suplementados com 1% de L-Arginina na lactação, não influenciaram o número de leitões ao desmame, mas observou um aumento no peso dos leitões no 13º e no 21º dia de idade e nos ganhos de peso dos leitões nos primeiros 13 dias e no período total de lactação. O que diverge dos resultados do presente estudo.

Já os resultados de Lima (2010) e Dallanora et al., (2016) corroboram com os resultados deste estudo, pois em ambos não foram observados efeito da suplementação

de arginina sobre o peso dos leitões e da leitegada e ganho de peso médio diário. Pesquisas anteriores realizadas por Carter et al. (2000), Devi e Kim (2015), Strathe et al., (2016), não observaram efeito da suplementação com L-Val sobre o número de leitões desmamados, condição corporal da matriz ou desempenho da leitegada concordando os nossos resultado. Em contradição aos nossos resultados, Craig et al., (2016), padronizaram o número de leitões após o parto em 13,4 e ao desmame tinham um número médio de 12,8 leitões desmamados, e observaram que os animais suplementados com 1,10% L-Val:L-Lis durante 28 dias de lactação ganharam 9 kg a mais em peso de leitegada em comparação com o controle.

### *Parâmetros sanguíneos*

A concentração de ureia é um indicativo da eficiência de utilização de nitrogênio na lactação (COMA; CARRION; ZIMMERMAN, 1995), sendo essa o principal produto final da oxidação de aminoácidos em mamíferos (MEIJER; LAMERS; CHAMULEAU, 1990). E seus níveis são indicadores sensíveis da ingestão de proteína, tem relação com os níveis de proteína na dieta (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Assim como a ureia, a creatinina é um indicador de catabolismo, que podem evidenciar balanço energético negativo, ou seja, níveis elevados sugerem maior degradação muscular a fim de atender a demanda nutricional para a síntese de leite.

Neste estudo a suplementação de L-Arg e L-Val não influenciaram os níveis plasmáticos de ureia, creatinina e proteínas totais entre os tratamentos, esses níveis alterados refletem mobilização de reservas corporais (BELSTRA; RICHERT; FRANK, 1998). E como visto, não houve influencia da suplementação com aminoácidos sobre as variáveis de condição corporal.

## **V. CONCLUSÃO**

A suplementação com Arginina e Valina no terço final da gestação e durante a lactação de matrizes suínas hiperprolíficas, não influenciou a condição corporal das matrizes suínas e, também não teve efeito sobre o desempenho dos leitões.

## REFERENCIAS

- AGRINESS. **Melhores da Suinocultura**. Disponível em: <<http://www.melhoresdasuinocultura.com.br>>. Acesso em: 25 de MARÇO de 2018.
- BOYD, R. D. et al. Recent advances in amino acid and energy nutrition of sows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 13, n. 11, p. 1638-1652, 2000.
- BASS, B. E.; BRADLEY, C. L.; JOHNSON, Z. B.; et al. Influence of dietary L-arginine supplementation of sows during late pregnancy on piglet birth weight and sow and litter performance during lactation. **Journal of Animal Science**, Volume 95, Issue 1, 1 January 2017, Pages 248–256, <https://doi.org/10.2527/jas.2016.0986>
- BASS, B. E. et al. Influence of dietary L-arginine supplementation to sows during late gestation on sow and litter performance during lactation. **Arkansas. Animal Science Department Report**, p.151-155, 2011.
- BELSTRA, B. A.; RICHERT, B. T.; FRANK, J. W. Effect of Gestation Dietary Crude Protein Level on the Gestation and Lactation Performance of Primiparous Sows. **Swine Day**, West Lafayette, v. 1, p. 60–64, Sept. 1998.
- BENELAM, B. 2009. Satiation, satiety and their effects on eating behaviour. **Nutr. Bull.** 34:126–173. doi:10.1111/j.1467- 3010.2009.01753.x
- BÉRARD, J.; BEE, G. Effects of dietary L-arginine supplementation to gilts during early gestation on fetal survival, growth and my fiber formation. **Animal, Cambridge**, v. 4, n. 10, p. 1680–1687, 2010.
- CARTER, S. D., G. M. HILL, D. C. MAHAN, J. L. NELSSSEN, B. T. RICHERT, AND G. C. SHURSON. 2000. Effects of dietary valine concentration on lactational performance of sows nursing large litters. NCR- 42 Committee on Swine Nutrition. **J. Anim. Sci.** 78:2879–2884.
- CHE, L. et al. Effects of dietary arginine supplementation on reproductive performance and immunity of sows. Czech. **Journal Animal Science**, v. 58, p.167–175, 2013.
- COMA, J.; CARRION, D.; ZIMMERMAN, D. R. Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to determine the lysine requirement of pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 472–481, 1995.
- CRAIG, A., A. GORDON, AND E. MAGOWAN. 2015. Review of scientific knowledge on lactation nutrition of highly prolific modern sows. In: Proc. British Soc. **Anim. Sci. Annu. Meet.**, Chester, UK. p. 244.
- DALLANORA, D. **Efeito da manipulação de aminoácidos na dieta de gestação e da inclusão de arginina na dieta de lactação sobre o desempenho de matrizes suínas e**

**leitões**. 2014. 70 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DALLANORA, D., M. P. WALTER, J. MARCON, C. SAREMBA, M. L. BERNARDI, I. WENTZ, AND F. P. BORTOLOZZO. 2016. Top-dressing 1% arginine supplementation in the lactation diet of sows does not affect the litter performance and milk composition. **Cienc. Rural** 46:1460–1465. doi:10.1590/0103-8478cr20141067

DEVI, M.; PARK, J. W; KIM, I. H. Effects of dietary valine:lysine ratios on lactation performance of primiparous sows nursing large litters Subramaniam. **R. Bras. Zootec.**, 44(12):420-424, 2015

DHAKAL, S. et al. Uterine spaciousness during embryo and fetal development in multiparous sows improves birth weight and postnatal growth performance. **Livestock Science**, Berlin, v. 153, p. 154-164, 2013.

GAO, K. et al. Dietary L -arginine supplementation enhances placental growth and reproductive performance in sows. **Amino Acids**, v.42, p.2207-2214, 2012.

JURASINSKI, C.; GRAY, K.; VARY, T.C. Modulation of skeletal muscle protein synthesis by amino acids and insulin during sepsis. **Metab. Clin. Exp.** 44: 1130–8, 1995.

KIM, S. W.; EASTER, R.A. Nutrient mobilization from body tissues as influenced by litter size in lactating sows. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2172–2178, 2001.

KIM, S.W. et al. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. **Journal of Animal Science**, v.87, p.123-132, 2009.

KING, R. H. et al. The response of first-litter sows to dietary protein level during lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 9, p. 2457-2463, 1993.

LEMES, M. A. G. **Arginina para matrizes suínas primíparas em lactação**. 2016. 59p. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

LIMA, A. L. **Resfriamento do piso da maternidade para matrizes em lactação no verão**. 2008. 42 p. Dissertação (Mestrado em Bioclimatologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

LIMA, D. de. **Dietas suplementadas com arginina para fêmeas suínas hiperprolíferas no período final da gestação e na lactação**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

MATEO, R. D. et al. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. **Journal of Animal Science**. v.86, p.827-835, 2008.

MATEO, R.D.; WU, G.; BAZER, F.W.; PARK, J.C.; SHINZATO, I.; KIM, S.W. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. **The Journal of Nutrition**, Volume 137, Issue 3, 1 March 2007, Pages 652–656, <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.652>.

MATSUNAGA, T. et al. **Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide**. *Circulation*, Baltimore, v. 105, n. 18, p. 2185-2191, Apr. 2002.

MEIJER, A. J.; LAMERS, W. H.; CHAMULEAU, A. F. M. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 701–748, 1990.

MOREIRA, R. H. R. **Arginina na nutrição de matrizes suínas hiperprolíficas**. 2014. 50 p. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of swine**. 11 ed. Washington, DC: National Academic Press, 2012.

PANZARDI, A. et al. Eventos cronológicos da gestação: da deposição dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino ao desenvolvimento dos fetos. In: \_\_\_\_\_. **Suinocultura em ação: a fêmea suína gestante**. 4. ed. Porto Alegre: UFRS, 2007. p. 43-71.

QUINIOU, N.; DAGORN, J.; GAUDRÉ, D. Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 63-70, Nov. 2002.

RAMONET, Y., M. C. MEUNIER-SALAUN, AND J. Y. DOURMAD. 1999. Highfiber diets in pregnant sows: Digestive utilization and effects on the behaviour of the animals. **J. Anim. Sci.** 77:591–599.

REYES, A. A.; KARL, I. E.; KLAHR, S. Role of arginine in health and in renal disease. **The American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 267, n. 3, p. F331-F346, Sept. 1994.

RICHERT, B. T., M. D. TOKACH, R. D. GOODBAND, J. I. NELSEN, J. E. PETTIGREW, R. D. WALKER, AND L. J. JOHNSON. 1996. Valine requirement of the high-producing lactating sow. **J. Anim. Sci.** 74:1307–1313.

RICHERT, B.T.; GOODBAND, R.D.; TOKACH, M.D. et al. Increasing valine, isoleucine, and total branched-chain amino acids for lactation sows. **Journal of Animal science**, v.75, p.2117-2128, 1997.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 252 p.

SCHENKEL, A. C. et al. Body reserve mobilization during lactation in first parity sows and its effect on second litter size. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 132, p. 165-172, Aug. 2010.

STRATHE, V.; BRUUN, T. S.; ZERRAHN J.-E. et al. The effect of increasing the dietary valine-to-lysine ratio on sow metabolism, milk production, and litter growth1. **J. Anim. Sci.** 2016.94:155–164 doi:10.2527/jas2015-9267.

TROTTIER NL, SHIPLEY CF, EASTER RA. 1994. Arteriovenous differences for amino acids, urea nitrogen, ammonia and glucose across the mammary gland of the lactating sow. **Journal of Animal Science** 72 (Suppl. 1), 332 (Abstr.).

WU, G. et al. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, n. 12, p. 2342-2349, Dec. 1997.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, London, v. 336, n. 11, p. 1-17, Nov. 1998.

ZHANG, S; ZENG, X; REN, M.; MAO, X; et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review . **Journal of Animal Science and Biotechnology** (2017) 8:10.DOI 10.1186/s40104-016-0139.

## ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 013/14, relativo ao projeto intitulado Arginina e aminoácidos de cadeia ramificada na nutrição de matrizes suínas hiperplólicas, que tem como responsável Márvio Lobão Teixeira de Abreu está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 26/05/2014.

Início do projeto:01/11/2014 - Término do projeto:20/07/2015

## CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 013/14, related to the project entitled "Arginine and branched-chain amino acids in the feed of hyperprolific sows", under the supervision of Márvio Lobão Teixeira de Abreu, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Institutional Animal Care and Use Committee (Standing Committees/PRP-UFLA), and was approved in May 26, 2014.

Project's beginning:01/11/2014 - Project's end:20/07/2015

Lavras, 26 de maio de 2014

  
Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA