

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA GLUTAMINA, DO GLUTAMATO E DE NUCLEOTÍDEOS
SOBRE O *TURNOVER* DO CARBONO ($\delta^{13}\text{C}$) EM TECIDOS DE LEITÕES
DESMAMADOS**

Alessandro Borges Amorim

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Zootecnia como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor, Área de
concentração Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU – SÃO PAULO

Dezembro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA GLUTAMINA, DO GLUTAMATO E DE NUCLEOTÍDEOS
SOBRE O *TURNOVER* DO CARBONO ($\delta^{13}\text{C}$) EM TECIDOS DE LEITÕES
DESMAMADOS**

Alessandro Borges Amorim

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutor, Área de concentração Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU – SÃO PAULO

Dezembro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Amorim, Alessandro Borges, 1983-
A524e Efeito da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos sobre o *Turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em tecidos de leitões desmamados / Alessandro Borges Amorim. - Botucatu : [s.n.], 2012

xii, 97 f. : il., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2012

Orientador: Dirlei Antonio Berto

Inclui bibliografia

1. Alimentos - Aditivos. 2. Aminoácidos na nutrição animal. 3. Glutamato. 4. Glutamina. 5. Isótopos estáveis. 6. Mucosa intestinal. 7. Suíno. I. Berto, Dirlei Antonio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

*“Eu segurei muitas coisas em minhas mãos e eu as perdi;
mas tudo que eu coloquei nas mãos de Deus eu ainda
posso.”*

(Martin Luther King)

Onde não posso pisar com meus pés, posso pisar com meus sonhos!!!

Dedico

*Aos meus pais, Zilda e Bivaldo, que sempre
estiveram ao meu lado e foram e são meu
ponto de equilíbrio.*

*Ao meu irmão Leandro Amorim e
sobrinha Sophia Amorim, que
nunca saíram dos meus
pensamentos e moram no meu
coração.*

Ofereço

*A pessoa que mais contribui com meu crescimento e
sempre esteve ao meu lado nessa caminhada....*

Juliana Freitas Martinez

*Ao Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto, pelo apoio, dedicação e
suporte ao longo do doutorado e da vida
profissional na instituição.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar cada minuto da minha vida, sem ti Senhor nada seria possível, meu sonho não se tornaria realidade.

Aos meus pais Bivaldo e Zilda, por estarem sempre presente, ajudando e apoiando em todos os momentos.

À minha namorada, Juliana, por novamente estar me apoiando e contribuindo com êxito nesta jornada.

Ao Prof. Dirlei, que sem a sua ajuda, dedicação e compreensão não conseguiria realizar essa conquista.

À todos os tios, tias e primos das famílias Amorim e Borges

Aos meus sogro e sogra, Sergio e Regina, por sempre mostrarem-se dispostos a ajudar, proporcionando-me um ambiente familiar.

Aos amigos (as) de infância que apesar da distância, sempre me lembro das cenas marcantes.

Ao Prof. Dr. José Roberto Sartori, pela colaboração e correção do trabalho, além do apoio no grupo de estudo.

À Profa. Juliana Denadai, sendo a primeira a compartilhar e ajudar na elaboração do projeto.

À Profa. Márcia Sartori, por estar sempre disposta a ajudar.

À Profa. Margarida, por ter depositado e acreditado no meu potencial, me proporcionando bons momentos profissionais dentro da FMVZ, além da amizade.

À Profa. Cristina, por estar novamente presente na minha vida profissional.

Ao Prof. Valdomiro, pela disposição de participar da defesa.

Aos companheiros de orientação, em especial à Mayra e ao Henrique com quem sempre contei com a dedicação, comprometimento e empenho na condução do projeto, além de cuidarem da Zara com muito carinho.

Aos amigos da UNESP-Botucatu - Mariana (Taradona), Diego (Gigio), João Fernando, Vitor, Carolina, Felipes, Priscilas, Rafael, Guilhermes, Julianas, Francine, Caroline, Filipe (Guedes), Cassio (Xem), Mayara, Laercio, Gisele, Murilo, Diego,

Alan, Fabiana, Thiago, Pedro, Ivan, Natali, Marcos, Robson, Edilson, Nathalia, Ana Carolina.... Aprendi muito, com cada um de vocês.

Aos colegas do setor de suínos – Marcão e Paulinho (Fundamentais na condução do projeto), Franco e Adriano.

Aos funcionários e conviventes do Centro de Isótopos Estáveis – Evandro, Cibele, Danilo, Guilherme, Vanessa, Vânia, Marcela, Luciane, Mariana, Silvia e o Prof. Ducatti.

Aos amigos de trabalho e departamento - Margarida, Ricardo, Alcides, Garcia, Kleber, Edson, Simone, Nicolau, Ana Silvia, Eraldo, Renato, Dalanezi, Barbosa, Gisele e Pezzato.

Ao Grupo GENAM - Mariana (Vuku), Nathalia (Piça), Livia (Peti), Nathalia (Mc), Marcela (Ky), (Santinha), (Paradão), Carolina, Mariana e Renata.

À galera do fut de quinta.

À todos os estagiários, que me ajudaram nos trabalhos de campo e de laboratório, sempre presentes e dispostos a ajudar.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto.

À empresa Ajinomoto, por disponibilizar os produtos utilizados nessa pesquisa.

Espero que eu tenha transmitido algo na vida de vocês

Meu MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

	Páginas
CAPÍTULO 1	
Considerações Iniciais	1
1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Consequências do desmame precoce.	4
2.2. Glutamina e Glutamato	6
2.3. Nucleotídeos	15
2.4. Técnica dos isótopos estáveis como ferramenta para avaliar a taxa de <i>turnover</i> celular	23
3. Referências	28
CAPÍTULO 2	
Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no <i>turnover</i> do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e na morfologia da mucosa intestinal de leitões desmamados	38
Resumo	39
Abstract	40
1. Introdução	41
2. Material e métodos	43
2.1. Experimento I.....	44
2.2. Experimento II.....	48
3. Resultados e discussão	50
3.1. Experimento I.....	50
3.2. Experimento II.....	56

4. Conclusão	62
5. Referências	63
CAPÍTULO 3	
Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no <i>turnover</i> do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em órgãos de leitões desmamados	67
Resumo	68
Abstract	69
1. Introdução	70
2. Material e métodos	71
3. Resultados e discussão	77
4. Conclusão	87
5. Referências	88
CAPÍTULO 4	
Implicações	91
Apêndices	94

LISTA DE TABELA

Páginas

CAPÍTULO 2

Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e na morfologia da mucosa intestinal de leitões desmamados

Tabela 1. Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais	45
Tabela 2. Composição nutricional calculada das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.	46
Tabela 3. Valores do sinal isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas fornecidas para as matrizes em lactação e para os leitões desmamados.....	46
Tabela 4. Valores de meia-vida ($T_{50\%}$) e troca de 99% ($t_{99\%}$) dos isótopos estáveis do ^{13}C do duodeno e jejuno de leitões.....	51
Tabela 5. Médias de altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas (PC) e relação altura das vilosidades:profundidade das criptas (AV:PC) do duodeno e jejuno de leitões alimentados com dietas controle (DC), dietas contendo glutamina (DG), dietas contendo glutamato (DAG) e dietas contendo nucleotídeos (DN) aos 21, 28, 35 e 42 dias de idade	57
Tabela 6. Médias da densidade das vilosidades (número das vilosidades/ mm^2) do duodeno e jejuno de leitões alimentados com dietas controle (DC), dietas contendo glutamina (DG), dietas contendo glutamato (DAG) e dietas contendo nucleotídeos (DN) aos 21, 28, 35 e 42 dias de idade	61

CAPÍTULO 3

Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos do *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em órgãos de leitões desmamados

Tabela 1. Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais	73
Tabela 2. Composição nutricional calculada das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.....	74
Tabela 3. Valores do sinal isotópico das dietas fornecidas para as matrizes em lactação e para os leitões desmamados.	74
Tabela 4. Valores de meia-vida ($T_{50\%}$) e troca de 95% ($t_{95\%}$) dos isótopos estáveis do ^{13}C do pâncreas, fígado, baço e rim de leitões	77

LISTA DE FIGURAS

Páginas

CAPÍTULO 1

Considerações iniciais

Figura 1. Estrutura química da glutamina	7
Figura 2. Estrutura química do glutamato	13
Figura 3. Estrutura química dos nucleotídeos	16
Figura 4. Estrutura química das bases nitrogenadas pirimídicas (citosina, uracila e timina) e púricas (adenina e guanina)	17

CAPÍTULO 2

Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no ajuste do carbono $\delta^{13}\text{C}$ e na morfologia da mucosa intestinal de leitões desmamados

Figura 1. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do duodeno de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).....	52
Figura 2. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do jejuno de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).....	53

CAPÍTULO 3

Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos do *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em órgãos de leitões desmamados

- Figura 1.** Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do pâncreas de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D)..... 78
- Figura 2.** Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do fígado de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D)..... 79
- Figura 3.** Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do baço de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D)..... 80
- Figura 4** Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do rim de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D)..... 81
- Figura 5.** Representação das equações exponenciais do peso de leitões dos 21 aos 35 dias de idade, alimentados com as dietas controle (DC), dietas contendo 1% de glutamina (DG), dietas contendo 1% de glutamato (DAG) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (DC)..... 82

Figura 6. Representação das equações exponenciais do peso de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com as dietas controle (DC), dietas contendo 1% de glutamina (DG), dietas contendo 1% de glutamato (DAG) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (DC).....	83
--	----

CAPÍTULO 1

Considerações iniciais

1. Introdução

O crescimento populacional vem se constituindo em grande estímulo à produção mundial de alimentos, fazendo com que diversos setores produtivos evoluam rapidamente. A demanda por proteína animal no Brasil e no mundo é atendida pela melhora na eficiência de produção nas criações. A suinocultura tem sido uma das principais atividades pecuárias responsáveis pela produção de proteína animal de alta qualidade, pelo fato dos suínos apresentarem bons índices produtivos e reprodutivos.

A tecnificação da suinocultura vem proporcionando aumento de desempenho e melhora da produtividade das matrizes por meio da redução do período de amamentação. Os leitões são desmamados precocemente, por volta de três semanas de idade, o que requer cuidados com esses animais, pois nessa idade uma série de necessidades relativas à nutrição deve ser atendida, em razão da imaturidade do sistema digestório.

A composição da dieta dos leitões é alterada, uma vez que o leite é substituído por dieta sólida, predispondo os animais a estresse de ordem nutricional que pode ocasionar redução na digestão dos alimentos (QUADROS et al., 2002) e provocar diarreias (VENTE-SPREEUWENBERG et al., 2003). Outro problema que merece destaque é a redução do consumo de alimentos, pois o leitão, nesse período, tem inadequada secreção de ácido clorídrico no estômago, o que limita a produção e a atividade das enzimas pancreáticas e intestinais.

Nos primeiros dias pós-desmame, os leitões não consomem alimento suficiente para atender às suas necessidades nutricionais. Normalmente, nesse período, os leitões não ganham peso, causando a saída tardia dessa fase de cria. Esse fato pode implicar economicamente na produção de suínos, além de ser fator determinante para o baixo

desempenho nas fases subsequentes dos animais (MAVROMICHALIS, 2001). Sendo assim, na tentativa de minimizar os efeitos negativos do desmame de leitões, são utilizados ingredientes altamente digestíveis e antimicrobianos na dieta, que visam reduzir os distúrbios nutricionais pós-desmame e reduzir a competitividade de bactérias patogênicas no lúmen intestinal, com o propósito de melhorar a taxa de crescimento, a conversão alimentar e reduzir a mortalidade por infecções clínicas e sub-clínicas.

Atualmente, a produção animal faz uso de vários antimicrobianos como melhoradores de desempenho, sendo este o setor que lidera mundialmente o consumo desses produtos (COSTA et al., 2007). No entanto, alguns países passaram a exigir a completa retirada dos antibióticos da alimentação animal diante da possibilidade de resistência dos micro-organismos aos antibióticos melhoradores de desempenho. Assim, pesquisas têm sido conduzidas visando a utilização de outras substâncias ou ingredientes que possam estimular o crescimento e a diferenciação das células imunológicas e intestinais dos leitões na fase pós-desmame (YU et al., 2002).

A glutamina, o glutamato e os nucleotídeos, são alguns desses aditivos que buscam substituir os antibióticos e proporcionar melhor disponibilidade dos nutrientes para os leitões. A glutamina é um combustível energético para os enterócitos e as células imunes, e é precursora de nucleotídeos, moléculas importantes no desenvolvimento e reparo das células imunes e intestinais.

O glutamato é o aminoácido intracelular mais abundante encontrado no corpo de animais e de humanos (NEWSHOLME et al., 2003), sendo considerado um aminoácido não-essencial, porém quando presente na dieta pode substituir a glutamina em diversos dos seus papéis metabólicos, incluindo a produção de energia e a síntese de aminoácidos (YI e ALLEE, 2006).

Os nucleotídeos exercem várias funções metabólicas e, entre elas, estão a participação no metabolismo de energia (ATP), são precursores de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e fazem parte de coenzimas, como NAD, FAD e CoA, que estão envolvidas em várias vias metabólicas e servem como ativadores intermediários para muitas reações, como por exemplo, a uracil-difosfato-glucose que é um precursor de glicogênio (SAUER et al., 2011).

Para comprovar a ação desses aditivos sob influencia de fatores ambientais, nutricionais e sanitários, a técnica dos isótopos estáveis pode ser útil, em estudos de fisiologia e nutrição animal, uma vez que mede a taxa de substituição (*turnover*) do carbono tecidual (CARRIJO et al., 2000).

2. Revisão de Literatura

2.1. Consequências do desmame precoce

O sistema digestório dos leitões passa por modificações gradativas, até que esteja preparado para a digestão de ingredientes de origem vegetal. Nas suinoculturas tecnificadas, normalmente, o desmame é realizado com idade em torno de 21 dias, quando os leitões não possuem seu sistema digestório completamente desenvolvido, dificultando a digestão dos nutrientes.

No desmame, a composição da dieta dos leitões sofre grande mudança, pois o leite é substituído por dieta sólida, predispondo-os a estresse de ordem nutricional que pode ocasionar redução na ingestão e na digestão dos alimentos (QUADROS et al., 2002) e provocar a ocorrência de diarreias (VENTE-SPREEUWENBERG et al., 2003). Assim sendo, existe a necessidade de fornecer dietas com alta palatabilidade,

digestibilidade e densidade nutricional, para melhorar o desempenho dos leitões no período pós-desmame.

Para o leitão, o desmame consiste não só na separação da mãe precocemente, mas também restabelecimento de novo grupo social e adaptação ao novo ambiente, às instalações da creche, ocorrendo redução no crescimento durante o período pós-desmame e resultando em perdas econômicas significativas para o suinocultor (McCRACKEN et al., 1995).

O desmame também causa alterações morfofuncionais no intestino, que estão relacionadas à imaturidade dos enterócitos em função da alta taxa de renovação, resultando no aumento do processo de mitose nas criptas, diminuição da altura das vilosidades e aumento na profundidade das criptas (TEIXEIRA et al., 2003). A etiologia das alterações intestinais é complexa e decorre de fatores como a imaturidade imunológica (LI et al., 1990), pois o leitão ao nascer tem seu sistema imunológico limitado e em desenvolvimento, além da supressão do fornecimento do leite da porca, que possui fatores intrínsecos como a IgA e fator de crescimento epidermal.

A alteração da forma física da dieta, a variação na proporção dos nutrientes e os fatores estressantes também contribuem para ocorrência de mudanças funcionais e estruturais dos órgãos que compõem o sistema digestório (CASTILLO-SOTO et al., 2004), ocasionando elevação do pH gástrico, pela inadequada secreção de ácido clorídrico no estômago (PLUSKE et al., 1997).

Atualmente, grande variedade de ingredientes tem sido utilizada como fonte moduladora da mucosa intestinal nas dietas pré-iniciais de leitões submetidos ao desmame precoce. O objetivo do uso destes ingredientes é o aumento da digestibilidade

das dietas, adequando-as ao grau de amadurecimento do trato gastrintestinal, que varia com a idade e o peso dos leitões ao desmame (BERTOL et al., 2000).

A composição da dieta é fator que pode alterar a morfologia intestinal e, portanto, afetar a saúde gastrintestinal do leitão (BOUDRY et al., 2004). Assim, várias alternativas de ingredientes e estratégias nutricionais como o uso de aditivos têm sido sugeridas nas dietas de suínos, visando superar os problemas associados ao desmame.

Os primeiros aditivos descritos na alimentação animal foram os antibióticos, amplamente utilizados na produção suína, com o propósito de melhorar a taxa de crescimento, a conversão alimentar e reduzir a mortalidade de leitões. Essas melhorias, normalmente, estão associadas ao controle de micro-organismos patogênicos que colonizam o trato gastrintestinal (NAGANAWA et al., 1996; AVATO et al., 2000). Entretanto, os indícios de desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, usados como melhoradores de desempenho e a possibilidade de resistência cruzada entre patógenos animais e humanos, reforçam a necessidade de busca de alternativas mais seguras e aceitáveis pela sociedade (OVERLAND et al., 2000).

A utilização de aditivos, dentre esses, a glutamina, o glutamato ou ácido glutâmico e os nucleotídeos na alimentação de suínos, tem a finalidade de substituir os antibióticos, promotores de crescimento, visando melhorar a maturidade intestinal e imunológica e, conseqüentemente, o desempenho em leitões recém-desmamados.

2.2. Glutamina e Glutamato

Todos os aminoácidos presentes nas proteínas são fundamentais aos animais. Entretanto, alguns são classificados como essenciais, ou seja, aminoácidos que o organismo animal não consegue sintetizar ou são sintetizados insuficientemente, e os

não-essenciais que são sintetizados pelos animais a partir de produtos comuns do metabolismo intermediário.

A glutamina (Gln) (Figura 1), que possui em sua composição química carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio (ROGERO e TIRAPEGUI, 2003), é o aminoácido livre mais abundante no fluído extracelular, além de ser precursora da síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucleicos, açúcares aminados (SHITH, 1990), glutatona, inúmeras glicoproteínas e poliaminas (WU, 2007). Funciona como combustível para o metabolismo das células de rápido *turnover* (RHOADS e WU, 2009).

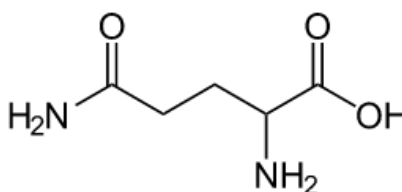


Figura 1. Estrutura química da glutamina.

Atualmente esse aminoácido pode ser designado como condicionalmente essencial ou semiessencial, pois pode se tornar metabolicamente indispensável para o organismo (YOUNG e MARCHINI, 1990), sob condição de estresse, infecções e lesões que acometem leitões desmamados (WANG et al., 2008).

Os primeiros a fazerem referências sobre a glutamina foram Hlasiwetz e Habermann em 1873, que a consideraram como uma molécula com propriedades biologicamente importantes. Em 1933, a glutamina foi isolada e sintetizada quimicamente a partir do suco de beterraba (MEISTER, 1965). Posteriormente, novas observações levaram os pesquisadores a pensar que a amônia encontrada em hidrolisados proteicos poderia ser o resultado da liberação de glutamina, bem como de

asparagina (CURI, 2000). Anos mais tarde, foi comprovado que as células possuem capacidade de sintetizar ou degradar glutamina (HISCOCK et al., 2003).

A glutamina é quantitativamente um dos aminoácidos mais importante dentro dos órgãos. Em estado catabólico e de injúrias intestinais, como as que ocorrem no desmame de leitões, a glutamina pode se tornar importante componente dietético para a manutenção do metabolismo, da estrutura e da função intestinal (FOX et al., 1988). Diferentemente da maioria dos aminoácidos, a glutamina apresenta dois grupos nitrogenados: alfa-amino [$\text{CH}(\text{NH}_2)$] e um grupo amida [$\text{NH}_2\text{-C}(\text{O})$], que são importantes no transporte de nitrogênio entre os diferentes tecidos e de amônia para os órgãos viscerais (DARMAUN e HUMBERT, 2000).

Dentre os tecidos e órgãos envolvidos na síntese e degradação da glutamina, incluem-se o músculo esquelético, pulmões, fígado, pâncreas, cérebro e o tecido adiposo, os quais contêm atividade da enzima glutaminase, que catalisa a hidrólise da glutamina e leva à formação de glutamato e amônia (MEISTER, 1980) ou da enzima glutamina sintetase, que catalisa a conversão de glutamina a partir de amônia e glutamato, na presença de ATP (BORGES et al., 2008).

O catabolismo proteico leva à produção de glutamina, de forma direta, e a síntese de aminoácidos de cadeia ramificada, como o aspartato, asparagina (ROGERO e TIRAPEGUI, 2000; RENNIE et al., 2001) e o glutamato que é responsável por 40% da síntese de glutamina (NEWSHOLME et al., 2003). Estudos em ratos demonstraram que os aminoácidos de cadeia ramificada são transaminados, quase que exclusivamente, com α -cetoglutarato para formar glutamato, que pode fornecer seu grupo amina para o piruvato, gerando alanina (HALL e WAGENMAKERS, 1998).

O fígado tanto produz como consome a glutamina, e utiliza a alanina produzida pela degradação da glutamina no intestino para a gliconeogênese (HAUSSINGER et al., 1990). A energia gerada pela oxidação do α -cetogluturato torna a glutamina e o glutamato substratos energéticos tão importantes quanto a glicose (MINAMI et al., 1992).

Burrin e Stoll et al. (2009) verificaram que a glutamina suprime eficazmente a oxidação da glicose nos enterócitos, enquanto que a glicose tem pouco efeito sobre a oxidação de glutamina. Entretanto, a glutamina e o glutamato são preferencialmente canalizados para oxidação mitocondrial, enquanto que a maior parte da glicose é utilizada para fins do metabolismo biossintético (FRIGERIO et al., 2008).

Ao trabalhar com ratos, Stoll et al. (1999) verificaram que a glutamina (55-70%), glutamato (52-64%) e aspartato (52%) incluída nas dietas é oxidada a dióxido de carbono. Entretanto, nem todos os carbonos são completamente oxidados em dióxido de carbono, sendo convertidos em lactato, alanina, prolina, citrulina, ornitina e, arginina e, em seguida, liberados na circulação (WINDMUELLER e SPAETH, 1976). O destino metabólico do nitrogênio destes aminoácidos não é totalmente compreendido. Entretanto, há provas que o nitrogênio derivado da glutamina e do metabolismo do glutamato, pode ser convertido a ureia no fígado (BÜNZEN et al., 2008).

No cérebro, a glutamina é o substrato para produção de neurotransmissores, glutamato e ácido gama-aminobutírico, sendo importante fonte de energia para o sistema nervoso. Caso o cérebro não receba suficientemente glicose, isso pode ser compensado por um incremento do metabolismo da glutamina (AYOUB, 2010).

Nos rins, a glutamina sintetase é imprescindível para o controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo (ATKINSON e CAMIEN, 1982).

Contudo, pela ação da glutaminase ocorre liberação de NH_3 nos rins, que se combina com H^+ liberado a partir da dissociação do ácido carbônico (H_2CO_3), formando NH_4^+ que é excretada pela urina. O HCO_3^- formado após a dissociação do H^+ , entra na circulação onde é importante para manutenção do pH do sangue (GSTRAUNTHALER et al., 2000).

Quando o sangue encontra-se muito ácido, a glutamina é direcionada para os rins, onde libera íons de bicarbonato para corrigir a acidose. Caso o pH seja muito básico, mais glutamina é enviada ao fígado, onde, através de uma outra reação, libera íons de hidrogênio e corrige a alcalose (AYOUB, 2010).

Além do fornecimento de energia, a glutamina serve como substrato para a produção de um tipo especial de beta endorfina, glicil-L-glutamina, importante peptídeo para regulação da pressão arterial e prevenção da depressão cardiorrespiratória. Este mesmo peptídeo também atua na função imune, uma vez que incrementa a atividade dos linfócitos (AYOUB, 2010).

A glutamina também tem importante papel na fase fetal dos leitões, pois possui características únicas no transporte e no metabolismo de carbono e de nitrogênio. De todos os aminoácidos transferidos para o feto, a glutamina é transferida em maior concentração (NEU, 2001). Wu et al. (2010) observaram que a concentração de glutamina no plasma sanguíneo de feto suíno foi superior à encontrada no plasma sanguíneo de vários mamíferos e foi constatado, também, maior quantidade deste em relação aos aminoácidos limitantes, como a lisina. Uma nutrição deficiente em glutamina na fase de gestação pode comprometer a formação do feto. Vonnahme et al. (2002) relataram que este problema é ainda mais grave na suinocultura moderna, pois fêmeas suínas são muito prolíficas o que demanda maiores cuidados com a nutrição.

Destacada a importância da glutamina, várias pesquisas vêm questionando a classificação da glutamina como aminoácido não-essencial, pois alguns autores sugeriram que a capacidade de síntese e estoque de glutamina endógena não é suficiente para atender às necessidades do organismo durante fases de estresse, estado hipercatabólico e durante período de jejum prolongado (PIEZYNOWSKI et al., 2001; ARNAUD et al., 2004), o que normalmente ocorre nos primeiros dias após o desmame de leitões.

As alterações nas condições gastrintestinais ocorrem em função da súbita alteração na microbiota intestinal, devido à troca da alimentação líquida para sólida, como também a troca de ambiente e separação da porca. Estudos, verificando a integridade da mucosa em leitões recém-demamados (PLUSKE et al., 1997; Van BEERS-SCHREURS et al., 1998), comprovaram que a brusca troca de alimentação causa alterações na altura das vilosidades e na profundidade das criptas intestinais que, conseqüentemente, reduz a digestão dos alimentos e a capacidade absorptiva do intestino delgado.

Além disso, os leitões são particularmente vulneráveis a infecções bacterianas, em decorrência de deficiências intrínsecas da sua resposta imune, sendo a contaminação por *Salmonella* e *Escherichia coli* uma das principais causas da subnutrição em leitões. Curi (2000) relatou que o processo infeccioso pode ocasionar diminuição da concentração plasmática e tecidual de glutamina, fato que pode provocar prejuízo à funcionalidade de leucócitos em leitões. Cabe ainda destacar que leitões estão sujeitos a intenso crescimento, o que faz com que apresentem maior *turnover* proteico, fenômeno que pode acarretar em maior utilização de glutamina.

Alguns estudos demonstraram vantagens da suplementação de glutamina na dieta de leitões desmamados. Wu et al. (1996) constataram que a suplementação de glutamina na dieta (1%) previne a atrofia das vilosidades do jejuno, durante a primeira semana, e melhora o crescimento de leitões, durante a segunda semana pós desmame. Liu et al. (2002), também, estudaram o efeito da suplementação de 1% de glutamina nas rações e observaram aumento na altura das vilosidades do duodeno e do jejuno dos leitões desmamados.

Caldara et al. (2010) demonstraram que a suplementação de 1% de glutamina, apresenta efeitos positivos na aceleração de *turnover* do carbono da mucosa intestinal, indicando resposta positiva no processo de renovação desse tecido. Zhou et al. (2012) justificaram que a suplementação de glutamina para leitões desmamados aumenta a expressão gênica, impede o estresse oxidativo, melhora a absorção de nutrientes e estimula o crescimento celular.

Avaliando a adição de glutamina na dieta de leitões desmamados aos 18 dias de idade, Kitt et al. (2002) verificaram melhora no desempenho, porém não observaram qualquer efeito sobre a altura das vilosidades do intestino. Resultados semelhantes foram encontrados por Abreu et al. (2010), trabalhando com suínos recém desmamados, pois observaram melhor ganho de peso de leitões alimentados com dieta contendo glutamina, porém não constataram efeitos na altura das vilosidades, na profundidade das criptas e nas populações de leucócitos e linfócitos.

Em estudos com leitões desafiados imunologicamente, Yi et al. (2005) observaram que a glutamina na dieta tem maior efeito na depressão do crescimento de *Escherichia coli*, em relação a animais não desafiados, melhorando a mucosa intestinal, através da modulação do eixo somatotrófico. Ewaschuk et al. (2012), trabalhando com

inoculação de *Escherichia coli in vitro* e *in vivo* na mucosa intestinal de leitões alimentados com dieta contendo glutamina, observaram diminuição da população de *Escherichia coli* no intestino e aumento na expressão do mRNA de citocinas da mucosa e concluíram que a glutamina pode ser útil na redução da severidade de infecções gastrintestinais, por aumentar as respostas de citocinas da mucosa.

O glutamato (Glu) (Figura 2) é o mais abundante aminoácido intracelular encontrado nos organismos (NEWSHOLME et al., 2003) e também é considerado um aminoácido não-essencial. Porém, quando presente na dieta, pode substituir a glutamina em diversos dos seus papéis metabólicos, incluindo a geração de energia e a síntese de aminoácidos (YI e ALLEE, 2006).

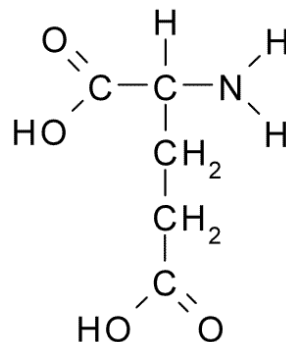


Figura 2. Estrutura química do glutamato.

Comumente é feita confusão envolvendo os termos glutamato e glutamato monossódico. O glutamato monossódico é um sal sódico do ácido glutâmico, que é um flavorizante extraído de fontes marinhas, muito utilizado na culinária asiática, enquanto glutamato é o termo utilizado comumente para designar a forma iônica do ácido glutâmico (AYOUB, 2010).

O glutamato dietético também tem papéis funcionais importantes no intestino, que aparentemente são diferentes daqueles da glutamina (REEDS et al., 2000). Reeds e

Burrin (2001) afirmaram que a glutamina e o glutamato se equiparam em sua importância como substratos para as células da mucosa intestinal, sob o ponto de vista metabólico.

Quase a totalidade do glutamato (95%) é metabolizado na passagem pela mucosa intestinal de leitões de 24 dias de idade, sendo 50% metabolizado a CO₂ (REEDS et al., 1996) o que caracteriza-o como substrato altamente oxidativo. Ewtushik et al. (2000) relataram que uma dieta suplementada com 6,51% de glutamato, evitou a atrofia das vilosidades do duodeno de leitões desmamados precocemente.

Estudo recente tem mostrado que uma boa integridade do trato gastrointestinal é importante para o metabolismo do glutamato da dieta. Burrin e Stoll (2009) observaram que, quando se aumenta de três a quatro vezes a ingestão do glutamato, a maior parte é metabolizada pelo intestino, para geração de ATP, ou para conversão em outros aminoácidos, como glutamina, aspartato e ornitina, que têm as concentrações aumentadas em 4,8, 4,0 e 2,7 vezes, respectivamente.

Liu e Jian (1999) constataram que tanto a suplementação de glutamina como de glutamato melhoraram o desempenho zootécnico de leitões desmamados. Resultados semelhantes foram encontrados por Jiang et al. (2009), que observaram melhora no ganho de peso diário e na conversão alimentar de leitões, quando alimentados com dietas contendo glutamina e glutamato, indicando que esses aditivos podem desempenhar papel importante na manutenção da integridade intestinal, resultando em melhora nos processos de digestão e absorção de nutrientes.

Molino et al. (2012) observaram que adição de glutamina e glutamato nas dietas contendo lactose (4 ou 8%) influenciou positivamente o ganho de peso dos leitões do desmame (21 dias) aos 49 dias de idade e aumentou a altura das vilosidades no

duodeno, jejuno e íleo e concluíram que houve melhora no desempenho e na morfologia da mucosa intestinal dos animais independentemente do nível de adição de lactose nas dietas.

Bünzen et al. (2008) estudaram os efeitos de um produto comercial à base de glutamina + ácido glutâmico (AminoGut®) sobre o desempenho e índice de diarreia em leitões desmamados aos 21 dias, alimentados com dietas de alta e baixa densidades nutricionais. Observaram que as dietas suplementadas com AminoGut, melhoraram o ganho de peso e a conversão alimentar, independentemente da densidade da dieta, entretanto, o nível ótimo recomendado do produto foi de 0,60% e de 0,78%, para dietas de alta e de baixa densidades, respectivamente.

Estudos com outras espécies animais também comprovaram o efeito da glutamina + glutamato (AminoGut®). Avellaneda et al. (2008) ao avaliaram a inclusão de AminoGut® (0,5; 1,0 e 1,5%) em dietas para frangos de corte, observaram aumento no ganho de peso e melhora na conversão, quando os frangos foram suplementados com 1,5% dos 1 a 25 dias de idade. Da mesma forma, Silva et al. (2010) adicionaram o produto na dieta de tilápias do nilo e observaram aumento no ganho de peso e na altura das vilosidades. Sakamoto et al. (2011) utilizaram 0,5; 1,5; 3,0 e 5,0% de AminoGut® na dietas de frangos de corte, recomendaram 2,8% do produto, como o melhor nível.

2.3. Nucleotídeos

Os nucleotídeos (Figura 3) são unidades estruturais dos ácidos nucleicos e desempenham diversas funções, fazendo parte de muitas coenzimas além de servirem como doadores de grupos fosforil e de açúcares (RODWELL e KENNELLY, 2006).

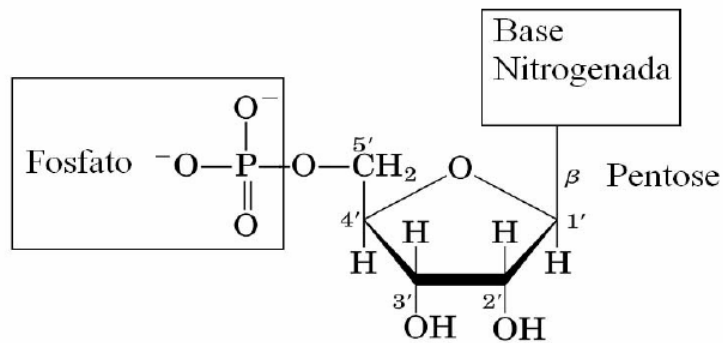


Figura 3. Estrutura química dos nucleotídeos.

São compostos por uma base nitrogenada (púricas ou pirimídicas), um fosfato e uma pentose (ribose ou desoxirribose). Por hidrólise parcial é possível retirar o radical fosfato dos nucleotídeos, resultando em estruturas denominadas nucleosídeos (LEHNINGER et al., 1995).

As bases nitrogenadas pirimídicas incluem citosina, uracila ou timina (Figura 4) e o ácido orótico ou ácido pirimidinocarboxílico, que está presente no leite dos ruminantes (LARSON e HEGARTY, 1979), e que é produzido como um produto intermediário durante a síntese da uridina 5-monofosfato. As bases púricas são adenina e guanina (Figura 4), que estão contidas no DNA.

Os nucleotídeos podem ser classificados como nutrientes imunomoduladores (McCOWEN e BISTRAN, 2003), sendo sintetizados pela via “de novo” no organismo utilizando seus precursores metabólicos, como a glutamina, o aspartato, a glicina, a ribose 5-fosfato, o CO_2 e a NH_3 , sendo a glutamina a mais importante. Entretanto, por essa via, altas quantidades de energia na forma de ATP são exigidas (CLIFFORD et al., 1976) e grandes quantidades dos precursores de aminoácidos são requeridas (MATEO et al., 2004).

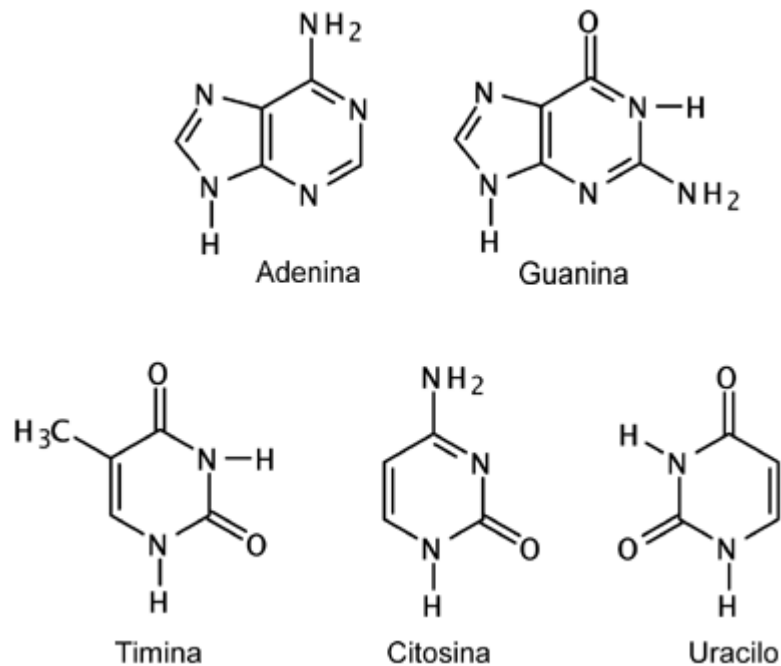


Figura 4. Estrutura química das bases nitrogenadas pirimídicas (citosina, uracila e timina) e púricas (adenina e guanina).

Outro mecanismo de síntese dos nucleotídeos é a via de “salvamento ou recuperação”, sendo essa via mais simples e com menor exigência energética (LERNER e SHAMIR, 2000). A via “de salvamento” é regulada em diversos pontos metabólicos, de forma a manter equilíbrio adequado de nucleotídeos (CARVER e WALKER, 1995).

Uauy (1989) sugeriu que a via “de salvamento” é dependente da disponibilidade de purinas livres e bases pirimídicas. Esta via requer menos energia do que as vias “de novo” e é caracterizada por serem mais simples, sendo resumida a uma única reação, que é catalisada pela enzima adenosina fosforribosil transferase, sendo que a adenosina livre reage com o pirofosfato fosforribosil, formando a adenina nucleotídeo correspondente (COSGROVE, 1998). Quando fornecidos nucleotídeos na alimentação, a via “de salvamento” recicla 90% ou mais das bases púricas (UAUY, 1989).

Geralmente, tem-se assumido que todas as células vivas são capazes de satisfazer as necessidades de nucleotídeos através de síntese “de novo”. No entanto, estudos recentes revelaram que em muitos tecidos, com exceção do fígado, a exigência de nucleotídeos não é atendida somente pela síntese “de novo”, mas também através da via “de salvamento” (GODDERIS et al., 2002, SAUER et al. 2011).

As células de rápido *turnover*, como os enterócitos, as células hematopoiéticas da medula óssea, os leucócitos e os linfócitos, apresentam capacidade limitada para síntese “de novo” das bases púricas e pirimídicas e requerem bases exógenas, que podem ser obtidas pela via “de salvamento” (SANDERSON e HE, 1994, UAUY, 1994), pois o organismo poupa a via de síntese “de novo”, dando preferência à via “de salvamento” (TSUJINAKA et al., 1997). O atendimento da exigência de bases exógenas acelera a síntese de DNA nas células, podendo auxiliar no crescimento e na recuperação de tecidos, principalmente em condições de estresse fisiológico (CARVER e WALKER, 1995).

Os nucleotídeos dietéticos são importantes para manutenção da saúde intestinal e modulação do sistema imunológico, favorecendo o crescimento dos hepatócitos (OHYANAGI et al., 1989), influenciando na expressão de genes no epitélio intestinal (SANDERSON e HE, 1994) e podem atuar como imunonutriente e promotor de crescimento (ROSSI et al., 2007).

Sauer et al. (2011) observaram várias funções metabólicas dos nucleotídeos e, entre elas, estão a participação no metabolismo de energia (ATP), funcionam como precursores de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e servem como mediadores fisiológicos, como, por exemplo, o monofosfato de adenosina cíclico que é um “segundo mensageiro” para vários processos metabólicos. Ainda, fazem parte dos componentes de

coenzimas, como NAD, FAD, e CoA, que são envolvidas em várias vias metabólicas e servem como ativadores intermediários para muitas reações, como por exemplo, a uracil-difosfato-glucose que é precursora de glicogênio.

Ao desmame, os leitões têm rápido crescimento celular e limitado consumo de ração, pois acontece a troca da alimentação líquida, rica em nutrientes altamente digestíveis, por uma dieta principalmente à base de ingredientes de origem vegetal, resultando em desafio imunológico. Assim sendo, várias pesquisas vêm buscando alternativas para melhorar ou amenizar essa fase, sendo a suplementação com nucleotídeos na dieta uma delas. Entretanto, Cosgrove (1998) relatou que a suplementação com nucleotídeos depende da forma iônica que é fornecido esse aditivo, pois os resultados de vários estudos ainda são contraditórios.

Nucleotídeos são encontrados, principalmente, em ingredientes ricos em proteínas (CLIFFORD et al., 1976), como as carnes e os frutos do mar (BARNESS, 1994). Fontes de levedura, como a levedura de cerveja, são ingredientes que também concentram nucleotídeos (TIBBETTES, 2002). No entanto, os ingredientes comumente utilizados na alimentação animal não são rotineiramente analisados para quantificação de nucleotídeos, limitando, assim, as informações sobre a presença e quantidade de nucleotídeos nos alimentos (SAUER et al., 2011).

Quando fornecidos exogenamente, os nucleotídeos têm capacidade limitada de passarem através das membranas celulares, pois o organismo tem sistema de transporte ineficiente. Além disso, os nucleotídeos possuem um grupo fosfato com carga negativa elevada, não permitindo sua absorção, pelo fato da membrana plasmática possuir carga positiva (SANDERSON e HE 1994). Em pequenas quantidades, os nucleotídeos dietéticos são ingeridos como nucleoproteínas, que precisam ser hidrolisadas pela

enzima protease, liberando ácidos nucléicos, que sofrem hidrólise parcial no estômago, sendo, em seguida, expostos às nucleases e às fosfoesterases pancreáticas, originando os nucleotídeos e os nucleosídeos. Posteriormente, os nucleotídeos e os nucleosídeos, pela ação de nucleotídases e nucleosidases, liberam as bases nitrogenadas (QUAN e UAUY, 1991).

Domeneghini et al. (2004) observaram que a adição de nucleotídeos na dieta de leitões recém-desmamados, aumentou a concentração de IgA no plasma, sem alterar a morfologia intestinal, número de bactérias patogênicas e desempenho dos animais. Por outro lado, Martinez-Puig et al. (2007) constataram redução da atrofia das vilosidades de leitões no pós-desmame quando receberam nucleotídeos na dieta.

Foi verificado por Tsujinaka et al. (1993) e Dell'Orto et al. (2002) efeito benéfico dos nucleotídeos na integridade das células intestinais, com aumento significativo das células da cripta. Os nucleotídeos também aumentaram o comprimento das vilosidades intestinais, e melhoraram a resposta imunitária, promovendo melhor absorção dos nutrientes e aumento do peso de leitões (YU et al., 2002). Pelícia et al. (2011) verificaram, ainda, que os nucleotídeos promovem aceleração no processo de renovação da mucosa intestinal e na regeneração após danos causados por coccidiose em frangos de corte.

Rutz et al. (2006) utilizaram extrato de levedura em dietas de frangos de corte e observaram melhora no ganho de peso e na conversão alimentar dos animais, sugerindo que esta melhora de desempenho é consequência do aumento da altura das vilosidades devido à ação dos nucleotídeos presentes no extrato de levedura. Resultados similares foram verificados por Shen et al. (2009), que observaram maior altura das vilosidades e

melhor relação altura das vilosidades:profundidade das criptas em leitões suplementados com levedura em comparação com leitões não suplementados.

Roselli et al. (2007) avaliaram o potencial do extrato de levedura na proteção contra o dano causado às células epiteliais do intestino delgado em suínos, pela *Escherichia coli* enterotoxigênica. Os autores demonstraram que a ação dos nucleotídeos contidos no extrato de leveduras, pode proteger as células contra o aumento da permeabilidade da membrana e, assim, proteger contra a entrada de *Escherichia coli* enterotoxigênicas. Andrés-Elias et al. (2007) concluíram que os nucleotídeos modulam a microbiota intestinal de leitões desmamados, através da estabilização da microbiota no íleo, sendo os nucleotídeos exógenos uma possível alternativa aos antimicrobianos promotores do crescimento.

Alguns estudos comprovaram melhor desempenho de leitões recém-desmamados, quando foram fornecidos nucleotídeos nas dietas. Calson et al. (2005) adicionaram extrato de levedura como fonte de nucleotídeos na dieta de leitões e observaram melhora na integridade do trato intestinal e, conseqüentemente, na digestão e absorção de nutrientes nos animais dos 21 aos 63 dias de idade. Van der Peet-Schwering et al. (2007) e Shen et al. (2009) afirmaram que os resultados encontrados com a suplementação de produto à base de levedura nas dietas de leitões, foram semelhantes aos encontrados com os promotores de crescimento antimicrobianos. Abreu et al. (2010) avaliando o efeito da inclusão de nucleotídeo nas rações, sobre o desempenho e a morfologia intestinal de leitões desmamados (21 dias) até os 42 dias de idade, encontraram melhora no ganho de peso dos animais.

Diversos estudos mostraram que as limitações fisiológicas digestivas do leitão, após o desmame, são os principais fatores predisponentes de diarreias comuns nessa

fase, devido às características da nova alimentação. Martinez-Puig et al. (2007) observaram que leitões suplementados com nucleotídeos tiveram menor incidência de diarreia e demonstraram redução da necessidade de utilização de antibióticos (15,63%; 3,13%; 1,56%) com o aumento dos níveis de nucleotídeos (0, 750 e 1000 ppm, respectivamente). Sauer et al. (2011) concluíram que a suplementação com nucleotídeos dietéticos tem efeitos benéficos sobre a recuperação intestinal após desafio imunológico e na resposta imune em situações patológicas diversas.

Os produtos comerciais de cultura de leveduras possuem quantidades variáveis de nucleotídeos, o que dificulta atribuir os efeitos biológicos observados exclusivamente aos nucleotídeos presentes nestes produtos (SAUER et al., 2011). Araújo et al. (2006) e Pelícia et al. (2011) sugeriram que diferentes processos de obtenção e secagem das leveduras podem afetar a qualidade dos produtos comerciais.

Os diferentes níveis de nucleotídeos que são adicionados às dietas podem modificar a integridade da mucosa intestinal em diferentes graus. Andrade et al. (2011) trabalharam com suplementação de diferentes níveis de nucleotídeos em dietas para leitões recém-desmamados e verificaram que a adição de nucleotídeos em dietas complexas não melhora o desempenho de leitões recém-desmamados. Entretanto, os nucleotídeos tiveram efeitos benéficos na morfometria do epitélio intestinal dos leitões, quando adicionado no nível de até 600 ppm. Além disso, o nível de 150 ppm proporcionou ganho de peso similar ao obtido com a adição de antimicrobianos nas dietas.

De acordo com Menten e Miyada (1995), a inclusão de aditivos em dietas complexas, aliada ao baixo desafio sanitário imposto aos leitões, manejo e ambiente adequados, dificilmente proporcionará melhoria no desempenho dos leitões recém-

desmamados. Desse modo, Andrade et al. (2011) não verificaram diferenças no desempenho de leitões suplementados com nucleotídeos e antimicrobianos nas dietas.

Van der Peet-Schwering et al. (2007) não verificaram aumento do comprimento das vilosidades e da profundidade das criptas, com a adição de produto comercial à base de levedura para leitões. Resultados semelhantes foram encontrados por Zavarize et al. (2011), que não observaram efeitos da inclusão de glutamina e nucleotídeos nas dietas de frangos de corte, sobre a altura e área das vilosidades e profundidade das criptas do duodeno, jejuno e íleo e também não verificaram efeito na relação das células caliciformes/enterócitos nas três porções do intestino delgado.

Apesar dos trabalhos ainda serem contraditórios, comprovou-se que os nucleotídeos podem ser utilizados na alimentação de leitões, conferindo maturidade intestinal, melhora no desenvolvimento do sistema imunitário e do desempenho dos leitões no desmame. Entretanto, devem-se levar em consideração a origem, os níveis de garantia dos nucleotídeos no produto comercial e os níveis de inclusão nas dietas.

2.4. Técnica dos isótopos estáveis como ferramenta para avaliar a taxa de *turnover* celular

Isótopos são espécies atômicas de mesmo elemento químico que possuem massas diferentes, pelo fato do número de nêutrons em seus núcleos serem distintos, ou seja, possuem o mesmo número de prótons, mas diferente número de nêutrons (MARTINELLI et al., 2009). Os isótopos estáveis são assim chamados por não alterarem a massa ao longo de sua existência, permitindo assim, que eles sejam utilizados com traçadores naturais de pesquisa.

O carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N) são considerados isótopos estáveis e ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. Kennedy e Krouse (1990) verificaram a ocorrência de dois isótopos estáveis de carbono na natureza o ^{12}C e ^{13}C com abundâncias naturais de 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente.

Em função dessa grande diferença na abundância natural dos isótopos estáveis do carbono, a mensuração da relação entre eles na maioria das amostras gera valores muito pequenos. Assim, para converter essa relação a uma magnitude manuseável, os valores do enriquecimento relativo do carbono-13 são expressos na terminologia dos isótopos estáveis, em delta per mil (δ) da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação a um padrão internacional definido, *Peedee Belemnite* (PDB).

O padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono e trata-se do fósfil carbonato sólido da era cretáceo, denominado *Belemnitela americana*, da formação PeeDee da Carolina do Sul, Estados Unidos (FRIEDMAN e O'NEILL, 1997).

De acordo com seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos, as plantas C_3 e as plantas C_4 , sendo o CO_2 atmosférico usado como fonte primária de carbono. No ciclo fotossintetizante C_3 o CO_2 atmosférico é reduzido, através do ciclo Calvin-Benson, em fosfoglicerato, molécula formada por três átomos de carbono, se comparado ao seu isótopo mais pesado, proporcionando aos vegetais ciclos enriquecidos relativo de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) entre -22 e -34‰. Já no ciclo fotossintetizante C_4 o CO_2 é reduzido, através do ciclo de Hatch-Slack, a ácido málico ou aspártico, com quatro carbonos, tornando seus tecidos mais pesados, que apresentam valores entre -9 e -16‰. Portanto, as plantas C_3 e C_4 possuem assinaturas isotópicas

distintas ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), devido ao fracionamento que ocorre durante a fixação fotossintética do carbono (SMITH e EPSTEIN, 1971; DUCATTI, 2007).

Assim a integração da composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção deve ser igual à composição isotópica de carbono da dieta (DENIRO e EPSTEIN, 1978). Hobson e Clark (1992) confirmaram que as composições isotópicas dos tecidos de animais geralmente assemelham-se às suas dietas, e esses traçadores vêm sendo utilizados com eficácia em vários estudos, com frangos de corte (CARRIJO et al., 2006), galinhas de postura (DENADAI et al., 2006), codornas de corte (MÓRI et al., 2008), suínos (CALDARA et al., 2010), peixes (VINAGRE et al., 2011) e outras espécies animais.

Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica nos tecidos corporais depende da velocidade com que os constituintes da nova dieta serão incorporados. Tecidos com rápido *turnover* refletirão dietas mais recentes, enquanto aqueles com taxas de *turnover* mais lentas refletirão dietas de períodos anteriores. De modo geral, os tecidos mais ativos metabolicamente apresentam taxas de *turnover* mais rápidas que os menos ativos (HOBSON e CLARK, 1992).

Baseados em resultados da literatura, Ducatti et al. (2002) propuseram um modelo teórico capaz de exprimir os resultados do enriquecimento relativo de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em função do tempo de alimentação, fornecendo aos animais dietas contrastantes em $\delta^{13}\text{C}$ (formuladas com grãos de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4) a animais.

Estabelecendo o *turnover* do carbono e as curvas de substituição isotópica em tecidos de leitões pela mudança de dietas com assinaturas isotópicas contrastantes, Caldara et al. (2008) verificaram valores de meia-vida de 9,2 e 10,2 dias para o fígado e

pâncreas, respectivamente, demonstrando que o *turnover* do carbono dietético variou entre os tecidos analisados.

Segundo Zuanon et al (2006) o *turnover* depende do crescimento animal e de outros fatores, como os ambientais, nutricionais e sanitários, sendo que esta estimativa apresenta valores distintos para um mesmo tecido, em diferentes fases da vida do animal, pois a taxa de crescimento varia de acordo com a idade.

Comparando a velocidade de substituição do carbono na mucosa intestinal de leitões desmamados alimentados com rações suplementadas ou não com glutamina, Caldara et al. (2010) verificaram que os animais que receberam rações sem adição de glutamina apresentaram valor de meia-vida quase duas vezes maior em relação àqueles alimentados com rações contendo 1% de glutamina, concluindo que a glutamina influencia a velocidade de troca do carbono no tecido.

O Capítulo 2, denominado “**Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no turnover do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e na morfologia da mucosa intestinal de leitões desmamados**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na Journal of Animal Science. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos no processo de renovação celular e na capacidade de adaptação dos leitões ao desmame, pelo estudo do *turnover* do ^{13}C da mucosa intestinal, e das alterações morfológicas do duodeno e do jejuno (altura das vilosidades, profundidade das criptas e densidade das vilosidades).

O Capítulo 3, denominado “**Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no turnover do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em órgãos de leitões desmamados**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira. O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos no *turnover* do carbono no pâncreas, fígado, baço e rim de leitões desmamados aos 21 dias de idade.

3. Referências

ABREU, M. L. T. et al. Glutamina, nucleotídeos e plasma suíno em rações para leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 520-525, 2010.

ANDRADE, C. et al. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 4, p. 788-796, 2011.

ANDRÉS-ELIAS, N. et al. Effect of nucleotides and carob pulp on gut health and performance of weanling piglets. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 108, p. 280–283, 2007.

ARAÚJO, L. F. et al. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 1576-1581, 2006.

ARNAUD, A.; RAMÍREZA, M.; BAXTER, J.H. Absorption of enterally administered N-acetyl-L-glutamine versus glutamine in pigs. **Clinical Nutrition**, Amsterdam, v. 23, p. 1303–1312, 2004.

AVATO, P. et al. Allylsulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. **Phytomedicine**, Jena, v. 7, p. 239-243, 2000.

AVELLANEDA, Y. et al. Efecto de la suplementación del glutamina y L-glutamato (Aminogut®) sobre el crecimiento temprano de pollos de engorde. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, Bogotá, v.55, p.77-90, 2008.

ATKINSON, D. E.; CAMIEN, M.N. The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH. **Current topics in cellular regulation**, Orlando, v. 21, p. 261-302, 1982.

AYOUB, M. B. **Glutamina, um aminoácido não essencial, porém “essencial”**. 2010. Disponível em: <www2.iq.usp.br/docente/henning/sinteseaminoacidos.pdf> Acesso em: 30 maio 2012.

BARNES, L. A. Dietary sources of nucleotides – from breast milk to weaning. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 128–130, 1994.

BERTOL, T. M.; LUDKE, J. V.; MORES, N. Efeito de diferentes fontes protéicas sobre desempenho, composição corporal e morfologia intestinal em leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, p. 1735-1742, 2000.

BORGES, M. C.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J. Suplementação enteral e parenteral com glutamina em neonatos pré-termo e com baixo peso ao nascer. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1. p.13-22, 2008.

BOUDRY, G. et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 1, p. 2256-2262, 2004.

BÜNZEN, S. et al. Recentes avanços na nutrição de suínos. **Simpósio Brasil Sul de Suinocultura**, 2008.

BURRIN, D. G.; STOLL, B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 90, p. 850–856, 2009.

CALDARA, F. R. et al. Efeito da glutamina sobre o turnover do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de músculos e vísceras de leitões desmamados: glutamina e turnover de carbono tecidual. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 3, n. 3, p. 291-297, 2008.

CALDARA, F. R. et al. Glutamina e *turnover* do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 12, p. 2664-2669, 2010.

CARLSON, M. S.; VEUM, T. L.; TURK, J. R. Effects of yeast extract versus animal plasma in weanling pig diets on growth performance and intestinal morphology. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 13, p. 204-209, 2005.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, p. 209-218, 2000.

CARRIJO, A. S. et al. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analyses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.8. p.37-42, 2006.

CARVER, J. D.; W. A. WALKER. The role of nucleotides in human nutrition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 6, p. 58–72, 1995.

CASTILLO-SOTO, W.L. et al. Efeito da substituição do farelo de soja pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte protéica em dietas para leitões desmamados sobre a morfologia intestinal e atividade das enzimas digestivas intestinais. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Maracaibo, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2004.

CLIFFORD A. J. et al. Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, n. 106, p. 428–50, 1976.

COSGROVE, M. Perinatal and infant nutrition. Nucleotides. **Perinatal and infant nutrition**, Fordham, v. 14, n. 10, p. 748–751, 1998.

COSTA, L. B., TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 589-595, 2007.

CURI R. Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: **Sprint**, 2000. 261 p.

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

DELL'ORTO, V.; GIANCAMILLO, D. I.; SAVOINI, A. Influence of nucleotides and glutamine dietary supplementation on gut health of weanling piglets. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 1, p. 220, 2002.

DENADAI, J. C. et al. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, p. 251-256, 2006.

DENIRO, M. L.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 42, p. 495-506, 1978.

DOMENEGHINI, C. et al. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 19, p. 49-58, 2004.

DUCATTI, C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007. 204 p. Apostila.

EWASCHUK, J. B. et al. Glutamine supplementation improves intestinal barrier function in a weaned piglet model of Escherichia coli infection. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 106, p. 870-877, 2012.

EWTUSHIK, A. L.; BERTOLO, R. F. P.; BALL, R. O. Intestinal development of early-weaned piglets receiving diets supplemented with selected amino acids or polyamines. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 80, p. 653-662, 2000.

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

FRIEDMAN, I.; O'NEIL, J. R. 1997. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In: Fleischer M. Eds. Data of Geochemistry 6^a ed. **Geological Survey Professional**, p. 1-12, 1997.

FRIGERIO, F. et al. Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1777, p. 965-972, 2008.

GODDERIS, B.M. et al. 2002. **The porcine and avian intestinal immune system and its nutritional modulation.** In. BLOCK, M.C.; VAHL, H.A. Academic Publishers, Wageningen, p. 97-134, 2002.

GSTRAUNTHALER, G. et. al. Differential expression and acid-base regulation of glutaminase mRNAs in gluconeogenic LLC-PK₁-FBPase⁺ cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 278, p. 227–237, 2000.

HALL, G. V.; WAGENMAKERS, A. J. M. Effect of carbohydrate supplementation on plasma glutamine during prolonged exercise and recovery. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v. 9, p. 82-86, 1998.

HÄUSSINGER, D. et al. Cell swelling inhibits proteolysis in perfused rat liver. **Biochemical Journal**, London, v. 272, p. 239-242, 1990.

HISCOCK, N. et al. Glutamine supplementation further enhances exercise-induced plasma IL-6. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 95, p. 145-148, 2003.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ¹³C in tissues. **The Cooper Ornithological Society**, Berkeley, v. 94, p. 181-188, 1992.

JIANG, Z. Y. et al. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, p. 4050–4056, 2009.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 68, p. 960-972, 1990.

KITT, S. J. et al. Effects of glutamine on growth performance and small intestine villus height in weanling pigs. **Nebraska Swine Reports**, Nebraska, p. 29-32, 2002.

LARSON, B. L.; HEGARTY, H. M. Orotic acid in milks of various species and commercial dairy products. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 62, p 1641–1644, 1979.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LERNER, A. M. D. M; SHAMIR, R. M. D. Nucleotides in infant nutrition: A must or an option. **Israel Medical Association Journal**, Ramatgan, v. 2, p. 772–774, 2000.

LI, D. F. et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 68, p.1790-1799, 1990.

LIU, T.; JIAN, P. Effects of glutamine and glutamate on the performance of early-weaned piglets. **Journal of Huazhong Agricultural University**, Wuhan, v. 18, p. 457-460, 1990.

LIU, T. et al. Effects of dietary glutamine and glutamate supplementation on small intestinal structure, active absorption and DNA, RNA concentrations in skeletal muscle tissue of weaned piglets during d 28 to 42 of age. **Asian Journal of Animal Science**, Seowon-dong, v. 16, n. 2, p. 238-242, 2002.

MARTINELLI, L. A. et al. Bases para uso da metodologia isotópica. In: **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo, 2009, 144p.

MARTINEZ-PUIG, D. et al. Dietary nucleotide supplementation reduces occurrence of diarrhoea in early weaned pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 108, p. 276–279, 2007.

MATEO, C. D.; PETERS, D. N.; STEIN, H. H. Nucleotides in sow colostrum and milk at different stages of lactation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, p. 1339–1342, 2004.

MAVROMICHALIS, I. Research into practice. **Pig Progress**, Doetinchem, v. 17, p. 32, 2001.

McCRACKEN, B. A. et al. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 11, p. 2838-2845, 1995.

MCCOWEN, K. C.; BISTRAN, B. R. Immunonutrition: problematic or problem solving. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 77, p. 764-770, 2003.

MEISTER, A. Biochemistry of the Amino Acids. **Academic Press Inc**: New York, v. 1, p. 349, 1965.

MEISTER, A. 1980. Catalítico mecanismo de glutamina sintetase: visão geral de glutaminametabolismo. In: J. MORA, R. PALACIOS (Ed.) Glutamina: metabolism, enzymology e regulamento. Academic Press, p. 1-40, 1980.

MENTEN, J. F. M.; MIYADA, V. S. 1995. Effects of antimicrobial feed additives, alone or in combination on weanling pigs. In: ANNUAL MEETING – AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1995, Orlando. **Proceedings...** Illinois: American Society of Animal Science. p.174, 1995.

MINAMI, H.; MORSE, E. L.; ADIBI, S. A. Characteristics and mechanism of glutamine-dipeptide absorption in human intestine. **Gastroenterology**, Maryland Heights, v. 103, p. 3-11, 1992.

MOLINO, J. P.; DONZELE, J. L.; OLIVEIRA, R. F. M. L-glutamine and L-glutamate in diets with different lactose levels for piglets weaned at 21 days of age. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 1, p. 98-105, 2012.

MÓRI, C. et al. Poultry offal meal traceability in meat quail tissues using the technique of stable carbon($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) isotopes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 10, p. 45-52, 2008.

NAGANAWA, R. et al. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4238-4242, 1996.

NEU, J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 2585-2589, 2001.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 153-163, 2003.

OHYANAGI, H. et al. Effects of nucleosides and a nucleotide on DNA and RNA syntheses by the salvage and de novo pathway in primary monolayer cultures of hepatocytes and hepatoma cells. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thousand Oaks, v.13, p.51-58, 1989.

OVERLAND, M. et al. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, p. 1875-1884, 2000.

PELÍCIA, V. C. et al. Nucleotídeos na dieta de frangos de corte e seus efeitos sobre taxa de *turnover* da mucosa intestinal antes e após lesões causadas por coccidiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1652-1659, 2011.

PIERZYNOWSKI, S. G. et al. 2001. Glutamine in gut metabolism. In: PIVA A.; BACHLUSEN, K.E.; LINDBERG, J.E. (Ed). **Gut environment of pigs**. Nottingham: Nottingham University Press, 2001. p. 43-62.

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

QUADROS, A. B. et al. Dietas simples e complexa sobre o desempenho de leitões na fase de creche. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 109-114, 2002.

QUAN, R.; UAUY, R. Nucleotides and gastrointestinal development. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, Philadelphia, v. 2, p. 3-6, 1991.

REEDS, P. J. et al. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 270, p. 413–418, 1996.

REEDS, P. J. et al. Intestinal glutamate metabolism. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 978-982, 2000.

REEDS, P. J.; BURRIN, D. G. Glutamine and the Bowel. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 2505–2508, 2001.

RENNIE, M. J. et al. Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 2488-2490, 2001.

RHOADS, J. M.; WU, G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino Acids**, v. 37 p. 111–122, 2009.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. O. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 36. p. 202-212, 2000.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. **Journal of Nutrition and Metabolism**, New York, v. 7, p. 106-117, 2000.

ROSELLI, M. et al. Effect of different plant extracts and natural substances (PENS) against membrane damage induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 in pig intestinal cells. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 21, p. 224–229, 2007.

ROSSI, P.; XAVIER, E. G.; RUTZ, F. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 05-12, 2007.

RUTZ, F. et al. Desempenho e características de carcaças de frangos de corte recebendo extrato de leveduras na dieta. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, p. 349-355, 2006.

SAKAMOTO, M. I. et al. Utilização da glutamina, associada ao ácido glutâmico, sobre o desenvolvimento e a atividade enzimática em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p. 962-972, 2011.

SANDERSON, I. R.; HE, Y. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 131–137, 1994.

SAUER, N.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The role of dietary nucleotides in single-stomached animals. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 24, p. 46-59, 2011.

SHEN, Y. B. et al. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, p. 2614–2624, 2009.

SILVA, L. C. R. et al. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 6, p. 1175-1179, 2010.

SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, p. 380-384, 1971.

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thousand Oaks, v. 14 p. 40-44, 1990.

STOLL, B.; BURRIN, D. G.; HENRY, J. Oxidação de substrato pelo portal drenado vísceras de leitões alimentados. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 277, p. 168-175, 1999.

TEIXEIRA, A. O. et al. Efeito de dietas simples e complexas sobre a morfo-fisiologia gastrintestinal de leitões até 35 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 926-934, 2003.

TIBBETTS, G. W. 2002. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal protein sources in food animal diets. In: ANNUAL SYMPOSIUM OF NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: University Press, p. 435-443.

TSUJINAKA, T. et al. Role of nucleosides and nucleotide mixture in intestinal mucosal growth under total parenteral nutrition. **Nutrition**, New York, v. 9, p. 532, 1993.

TSUJINAKA, O. et al. Role of Supplementation of a Nucleic Acid Solution on the Intestinal Mucosa Under Total Parenteral Nutrition. **Nutrition**, New York, v. 13, n. 4, p. 369-371, 1997.

UAUY, R. **Dietary nucleotides and requirements in early life**. In: Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy. 2 ed. E. Lebenthal, New York, p. 265–280, 1989.

UAUY, R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, p. 157-159, 1994.

Van BEERS-SCHREURS, H. M. G. et al. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 947-953, 1998.

Van DER PEET-SCHWERING, C. M. C. et al. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 85, p. 3099–3109, 2007.

VENTE-SPREEUWENBERG, M. A. M. et al. Interrelationships between gut morphology and faeces consistency in newly weaned piglets. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 3, p. 85-94, 2003.

VINAGRE, C. et al. Effect of body size and body mass on d13C and d15N in coastal fishes and cephalopods. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 95, p. 264-267, 2011.

VONNAHME, K. A. et al. Impacts on conceptus survival in a commercial swine herd. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, p. 553-559, 2002.

WANG, J. et al. Gene Expression Is Altered in Piglet Small Intestine by Weaning and Dietary Glutamine Supplementation. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 138, p. 1025–1032, 2008

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH. A. E. Metabolism of absorbed aspartate, asparagine, and arginine by rat small intestine *in vivo*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v. 175, p. 670–676, 1976.

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

WU, G. Papéis importantes da glutamina na nutrição e produção animal. **Aminogut® Ciência e Prática na Nutrição de Leitões (Boletim Especial Ajinomoto)**, Texas, p.7-9, 2007.

WU, G.; BAZER, F. W.; JOHNSON, G. A. Triennial growth symposium: important roles for l-glutamine in swine nutrition and production. **American Society of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 2017–2030, 2010.

YI, G. F. et al. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of Escherichia coli K88+-challenged weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 83, p. 634–643, 2005.

YI, G. F.; ALLEE, G. L. **Revisão de literatura: Glutamina (Gln) e Glutamato (Glu)**. 2006. Disponível em: <<http://www.lisina.com.br>>. Acesso em: 28 jun 2012.

YOUNG, V. R.; MARCHINI, J. S. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in human. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 51, p. 270 -289, 1990.

YU, I. T. et al. Roles of glutamine and nucleotides in combination in growth, immune responses and FMD antibody titres of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, p. 379-385, 2002.

ZAVARIZE, K. C. et al. Glutamina e nucleotídeos na dieta de frangos de corte criados no sistema alternativo. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, n. 60, p. 1-8, 2011.

ZHOU, Y. et al. Improvements of immune status, intestinal integrity and gain performance in the early-weaned calves parenterally supplemented with l-alanyl-l-glutamine dipeptide. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 145, p. 134– 142, 2012.

ZUANON, J. A. S. et al. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of growth and carbon *turnover*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 145, p. 101-107, 2006.

CAPÍTULO 2

Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e na morfologia da mucosa intestinal de leitões desmamados

Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos no *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e na morfologia da mucosa intestinal de leitões desmamados

RESUMO – As consequências do desmame precoce são, alterações nas características das vilosidades e das criptas do intestino delgado dos leitões, comprometendo a eficiência dos processos de digestão e de absorção de nutrientes. Foram realizados dois experimentos com o objetivo de verificar a influência das dietas no *turnover* do carbono e na morfologia da mucosa do duodeno e jejuno de leitões desmamados aos 21 dias de idade. As dietas foram sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (DC); contendo 1% de glutamina (DG); contendo 1% de glutamato (DAG) e contendo 1% de nucleotídeos (DN). No primeiro experimento foram utilizados 123 animais, sendo abatidos três leitões no dia 0 e três animais de cada tratamento nos dias 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 20, 27 e 49 após o desmame, para coleta de amostras da mucosa do duodeno e jejuno, que foram analisadas quanto à composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e mensurada a velocidade de substituição do carbono no tempo. No segundo experimento foram utilizados 65 animais, em delineamento experimental em blocos ao acaso, com arranjo fatorial dos tratamentos $4 \times 3 + 1$ (quatro dietas: DC, DG, DAG e DN, três épocas de abate: 7, 14 e 28 dias pós desmame e abate no desmame: dia 0), para análises morfológicas. Os valores da meia-vida do carbono para o duodeno foram 7,3; 7,6; 6,2 e 5,2 dias e para o jejuno de 7,1; 6,7; 6,2 e 4,9 dias para as DC, DG, DAG e DN, respectivamente. As dietas não alteram a altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas (PC) e relação altura das vilosidades: profundidade das criptas (AV:PC), com exceção da DN que determinou maior PC no duodeno, quando comparado com a DAG. A inclusão de 1% de nucleotídeos ou de 1% de glutamato nas dietas de leitões acelera o *turnover* do carbono da mucosa intestinal, sugerindo sua recuperação mais rápida no período pós-desmame, porém, nenhum efeito consistente da ação dos produtos avaliados foi comprovado pelos resultados das análises morfológicas realizadas, indicando que a técnica do *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) pode ser uma ferramenta importante nos estudos sobre a ação trófica de aditivos na mucosa intestinal de leitões.

Palavras-chave: aditivos, epitélio intestinal, isótopos estáveis, suínos

Effect of glutamine, glutamate and nucleotides on carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) and the morphology of the intestinal mucosa of weaned piglets

ABSTRACT - The consequences of early weaning are the changes in the characteristics of the small intestine villus and crypts of piglets, reduce the efficiency of digestion and absorption of nutrients. Two experiments were conducted in order to study the influence of diets on carbon turnover and morphology of the mucosa of the duodenum and jejunum of piglets weaned at 21 days of age. The diets were: Diets without glutamine, glutamate and nucleotides (DC); containing 1% of glutamine (DG); containing 1% of glutamate (DAG) and containing 1% of nucleotides (DN). In the first experiment a hundred twenty three animals were used and three of them were slaughtered at day 0 and three animals from each diets on days 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 20, 27 and 49 after weaning, for collecting samples of mucosa duodenum and jejunum was taken, which were analysis for the isotopic composition $\delta\%^{13}\text{C}$ and measured the time of carbon substitution. In the second experiment, sixty five animals were used in a randomized complete blocks design experiment with a 4x3x1 factorial arrangement of diets (four diets: DC, DG, DAG and DN; three slaughter ages: 7,14 and 28 days post weaning and slaughter at weaning day: day 0) for morphology analysis. The values of carbon half-life into the duodenum were 7.3, 7.6, 6.2 and 5.2 and into the jejunum were 7.1, 6.7, 6.2 and 4.9 for DC, DG, DAG and DN, respectively. Diets do not change the villus height (VH), crypt depth (PC) and villus:crypt ration (AV:PC), except that DN determined that most PC duodenum compared with the DAG. The inclusion of 1% of nucleotides or 1% of glutamate in the diet of piglets accelerates the carbon turnover of intestinal mucosa, suggesting a faster recovery post-weaning, however, was not evaluated any effect on the action of products by results of morphology analysis, indicating that the technique of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotope can be an important tool in studies of the trophic action of additives in the intestines of piglets.

Keywords: additives, intestinal epithelium, pigs, stable isotopes

1. Introdução

A crescente necessidade da produção mundial por alimentos fez com que diversos setores produtivos evoluíssem rapidamente. Pelo fato dos suínos apresentarem bons índices produtivos e reprodutivos, a suinocultura tem sido uma das principais atividades pecuárias responsáveis pela produção de proteína animal de alta qualidade. Em função das exigências do mercado consumidor, buscou-se através do melhoramento genético e da melhora da ambiência, das estratégias nutricionais e das condições sanitárias, produzir cada vez mais carne em curto espaço de tempo, o que exigiu inovações nas técnicas de manejo dos suínos, como a redução no número de dias na lactação. Para alcançar altos níveis produtivos, os leitões passaram a ser desmamados mais jovens e, como consequências do estresse imposto pelo desmame, podem ser destacadas as mudanças na estrutura da mucosa intestinal e a piora no desempenho (MORÉS et al., 1995).

Com o propósito de melhorar a taxa de crescimento, a conversão alimentar e reduzir a mortalidade por infecções clínicas e sub-clínicas em leitões, os antibióticos surgiram como os primeiros aditivos descritos na alimentação animal (AVATO et al., 2000). Entretanto, os indícios de desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos usados como promotores de crescimento e a possibilidade de resistência cruzada entre patógenos animais e humanos, reforçam a necessidade de buscar alternativas mais seguras e aceitáveis pela sociedade (OVERLAND et al., 2000).

Sendo assim, estudos têm sido realizados com glutamina, glutamato e os nucleotídeos nas dietas de leitões recém-desmamados, mostrando o efeito trófico na mucosa intestinal e melhorando o desempenho nessa fase (RODWELL e KENNELLY,

2003; YI e ALLEE, 2006; RHOADS e WU, 2009), podendo, portanto, serem possíveis substitutos dos antibióticos e de outros aditivos melhoradores de desempenho.

A glutamina funciona como combustível para o metabolismo das células de rápido *turnover* (RHOADS e WU, 2009). O glutamato, quando presente na dieta, pode substituir a glutamina em diversos dos seus papéis metabólicos, incluindo a geração de energia e a síntese de aminoácidos (YI e ALLEE, 2006). Os nucleotídeos, além de serem constituintes dos ácidos nucleicos, fazem parte de muitas coenzimas, além de servirem como doadores de grupos fosforil e de açúcares (SAUER et al., 2011).

Atualmente, existem técnicas capazes de verificar o *turnover* do carbono nos tecidos, objetivando calcular o tempo de substituição desse elemento em determinado tecido do corpo animal, sendo essa técnica denominada diluição isotópica. Ducatti (2002) verificou que a entrada e, conseqüente metabolismo de compostos de carbono com $\delta^{13}\text{C}$ diferente do tecido já formado, caracteriza um processo de diluição isotópica do carbono tecidual, que envolve a entrada de novos compostos de carbono provenientes da dieta, a saída de compostos de carbono decorrente do metabolismo tecidual, e o acréscimo de novo tecido, advindo do crescimento. Na integração dos processos para avaliar as alterações na composição isotópica de carbono, o crescimento entra com o sinal negativo por se tratar de um processo que, juntamente com o *turnover* metabólico, contribui para a diluição do $\delta^{13}\text{C}$ tecidual, em função do tempo.

Em função do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos no processo de renovação celular e na capacidade de adaptação dos leitões ao desmame, pelo estudo do *turnover* do ^{13}C e das alterações morfológicas da mucosa do duodeno e do jejuno (altura das vilosidades, profundidade das criptas e densidade das vilosidades).

2. Material e métodos

O projeto de pesquisa, conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), dessa instituição sob o protocolo n. 32/2011 – CEUA.

Utilizou-se 188 leitões desmamados, machos castrados e fêmeas de linhagem comercial, que foram alojados em galpão de creche construído em alvenaria e confinados em baias metálicas suspensas de 1,0 x 1,75 m. As baias eram compostas por piso parcialmente ripado e equipadas com comedouros, bebedouros tipo chupeta e campânula de aquecimento. O controle da temperatura interna da sala de creche era realizado com a regulagem das cortinas laterais e com o manejo das campânulas de aquecimento.

Os leitões foram submetidos ao programa de alimentação por fases, de modo a atender às exigências nutricionais, de acordo com Rostagno et al. (2011), nas seguintes fases: pré-inicial I dos 21 aos 35 dias, pré-inicial II dos 36 aos 49 dias e inicial dos 50 aos 70 dias de idade. As rações foram fornecidas à vontade.

Os tratamentos avaliados foram: Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle - DC); Dietas contendo 1% de glutamina (DG); Dietas contendo 1% de glutamato (DAG) e Dietas contendo 1% de nucleotídeos (DN).

A principal fonte energética das rações foi a quirera de arroz, matéria prima oriunda de planta do ciclo fotossintético C₃, para que apresentassem sinal isotópico de ¹³C distinto das dietas fornecidas às matrizes, cuja ração de lactação apresentava valor de $\delta^{13}\text{C}$ de -16,14‰, pois possuía como fonte energética principal o milho que é uma

planta de ciclo fotossintético C₄. As composições percentuais e os valores nutricionais calculados das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, e na Tabela 3 são mostrados os valores do sinal isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas das matrizes em lactação e dos leitões desmamados.

2.1. Experimento I

Foram utilizados 123 leitões desmamados, em delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro tratamentos (dietas apresentadas na Tabela 1). Nos dias 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 20, 27 e 49 após o desmame, foram abatidos, após insensibilização elétrica, três leitões por tratamento. No dia do desmame (dia zero) também foram abatidos três leitões, com o objetivo de expressar a composição isotópica dos tecidos, que até então era função da ração fornecida às matrizes nas fases de gestação e de lactação e as rações fornecidas aos leitões na lactação. As coletas foram concentradas nos primeiros dias do período experimental devido à maior velocidade na diluição isotópica do ^{13}C nos tecidos durante essa fase (HOBSON e CLARK, 1992).

Após insensibilização elétrica e abate, o ventre dos animais foi aberto e foram retirados os segmentos de aproximadamente 20 cm de comprimento das porções proximais do duodeno e do jejuno, que foram lavados com água deionizada, em seguida foram abertos pela borda mesentérica, lavados novamente e coletadas amostras de mucosa através de raspagem com lâmina de vidro. As amostras da mucosa foram acondicionadas em frascos plásticos (ependorfs de 1,50 mL), identificadas e imediatamente congeladas (-18°C) até a sua preparação para as análises isotópicas.

Tabela 1. Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.

Ingredientes, %	Dietas pré-iniciais I				Dietas pré- iniciais II				Dietas iniciais			
	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN
Arroz, quirera	57,41	56,41	56,41	56,41	60,51	59,51	59,51	59,51	64,25	63,25	63,25	63,25
Soja, farelo 46	20,00	20,00	20,00	20,00	25,00	25,00	25,00	25,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Concentrado proteico de soro de leite	6,80	6,80	6,80	6,80	3,70	3,70	3,70	3,70	-	-	-	-
Maltodextrina	6,66	6,66	6,66	6,66	3,17	3,17	3,17	3,17	-	-	-	-
Farelo do glúten de milho 60%	2,60	2,60	2,60	2,60	1,69	1,69	1,69	1,69	1,30	1,30	1,30	1,30
Óleo de soja	1,48	1,48	1,48	1,48	1,53	1,53	1,53	1,53	1,50	1,50	1,50	1,50
Glutamina (99%)	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-
Glutamato (98,5%)	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-
Nucleotídeos ¹ (97%)	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00
Fosfato bicálcico	1,25	1,25	1,25	1,25	1,50	1,50	1,50	1,50	1,23	1,23	1,23	1,23
Calcário calcítico	1,03	1,03	1,03	1,03	0,90	0,90	0,90	0,90	0,83	0,83	0,83	0,83
Cloreto de sódio	0,59	0,59	0,59	0,59	0,62	0,62	0,62	0,62	0,46	0,46	0,46	0,46
L-Lisina HCl (78,4%)	0,77	0,77	0,77	0,77	0,55	0,55	0,55	0,55	0,09	0,09	0,09	0,09
DL-Metionina (99%)	0,23	0,23	0,23	0,23	0,21	0,21	0,21	0,21	-	-	-	-
L-Treonina (98%)	0,31	0,31	0,31	0,31	0,22	0,22	0,22	0,22	-	-	-	-
L-Triptofano (99%)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	0,02	0,02	0,02	-	-	-	-
L-Valina (96,5%)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,03	0,03	0,03	0,03	-	-	-	-
Óxido de zinco (77%)	0,34	0,34	0,34	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de colina (60%)	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Antioxidante BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix mineral ²	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico ³	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Edulcorante ⁴	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

¹5'-Inosinato dissódico e 5'-guanilato dissódico.

²Premix mineral suprindo as seguintes quantidades por kg de ração: Ferro - 40 mg, Cobre - 35 mg, Manganês - 20 mg, Zinco - 40 mg, Cobalto - 0,36 mg, Iodo - 0,84 mg, Selênio - 0,12 mg;

³Premix vitamínico suprindo as seguintes quantidades por kg de ração: Vit. A - 25000 UI, Vit. D3 - 5000 UI, Biotina - 5 mg, Niacina - 10 mg, Pantotenato de cálcio - 30 mg, Vit. B12 - 70 µg, Vit. B2 - 18 mg, Vit. E - 75 mg, Vit. K3 - 1 mg;

⁴Composto por sacarina sódica, neoespiridina e dióxido de silício.

Tabela 2. Composição nutricional calculada das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.

	Dietas pré-iniciais I				Dietas pré- iniciais II				Dietas iniciais			
	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN
EM (kcal/kg)	3400	3400	3400	3400	3383	3383	3383	3383	3370	3370	3370	3370
PB (%)	19,00	19,00	19,00	19,00	19,55	19,55	19,55	19,55	19,90	19,90	19,90	19,90
Lisina dig. (%)	1,45	1,45	1,45	1,45	1,33	1,33	1,33	1,33	1,01	1,01	1,01	1,01
Metionina dig. (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,50	0,50	0,50	0,50	0,31	0,31	0,31	0,31
Valina dig. (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	0,92	0,92	0,92	0,92	0,20	0,20	0,20	0,20
Treonina dig. (%)	0,91	0,91	0,91	0,91	0,84	0,84	0,84	0,84	0,64	0,64	0,64	0,64
Triptofano dig. (%)	0,26	0,26	0,26	0,26	0,24	0,24	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23
Lactose (%)	10,00	10,00	10,00	10,00	5,01	5,01	5,01	5,01	-	-	-	-
Cálcio (%)	0,82	0,82	0,82	0,82	0,83	0,83	0,83	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72
Fósforo disp. (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,34	0,34	0,34	0,34

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos. Considerando os valores nutricionais dos ingredientes propostos por ROSTAGNO et al. (2011).

Tabela 3. Valores do sinal isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas fornecidas para as matrizes em lactação e para os leitões desmamados.

Dietas	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Lactação	-16,14
Pré-inicial I	
DC	-26,86
DG	-26,44
DAG	-26,76
DN	-29,02
Pré-inicial II	
DC	-27,11
DG	-27,76
DAG	-26,14
DN	-27,30
Inicial	
DC	-27,46
DG	-28,10
DAG	-28,87
DN	-27,17

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

Para a realização das análises isotópicas da mucosa intestinal, as amostras foram previamente descongeladas e secas por liofilização por um período de 24 horas. Após a secagem, as amostras foram pesadas (50 a 70 μg) dentro de cápsulas de estanho e posteriormente analisadas.

Para determinação da composição isotópica das amostras foi utilizado o espectrômetro de massas (Delta S-Finnigan Mat) acoplado ao Analisador Elementar (EA 1108-CHN-Fisions Instruments) do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. Os resultados foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão internacional Peedee Belemnite (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2 ‰ e calculado pela equação:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{amostra, padrão}) = [(R \text{ amostra}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3, \text{ onde:}$$

$\delta^{13}\text{C}$ é o enriquecimento da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão (Adimensional);

R = razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão (Adimensional).

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nas amostras, foi empregada a função exponencial do tempo, de acordo com Ducatti et al. (2002) expressa pela equação:

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)] e^{-kt}, \text{ onde:}$$

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t) (Adimensional);

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final (Adimensional);

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial (Adimensional);

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹;

t = tempo (em dias) desde a substituição da ração.

A meia-vida ($T_{50\%}$) do carbono na mucosa intestinal nos tratamentos, em $t = T$, foi calculada pela equação:

$$T_{50\%} = \ln 2/k$$

O tempo total ($t_{99\%}$) necessário para que ocorra a substituição dos átomos iniciais pelos átomos finais pode ser determinada pela equação:

$$t_{99\%} = (-1/k) \ln(1-F), \text{ onde:}$$

$t_{99\%}$ = 99% de substituição dos átomos iniciais pelos finais, unidade: tempo (dias);

\ln = logaritmo neperiano;

F = valor de átomos trocados, que pode variar de zero a 0,99;

k = constante de *turnover*, unidade: dia^{-1} , fornecendo uma ideia de “velocidade” no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (DUCATTI et al., 2002; DUCATTI, 2007).

Os dados das análises isotópicas foram analisados pelo método de equações exponenciais de primeira ordem do software Minitab® 16.

2.2. Experimento II

Utilizaram-se 65 leitões desmamados em delineamento de blocos ao acaso, com arranjo fatorial dos tratamentos $4 \times 3 + 1$, quatro dietas, de acordo com a Tabela 1, três épocas de abate: 7, 14 e 21 dias pós-desmame e um abate no dia do desmame.

No dia do desmame (dia zero) foram abatidos, após insensibilização elétrica, cinco leitões e nos dias 7, 14 e 28 dias de idade pós desmame, mais cinco leitões alimentados com cada uma das dietas, totalizando 20 leitões por abate.

Imediatamente após o abate, foram colhidas amostras de $\pm 1,5$ cm das porções proximais do duodeno e do jejuno, que foram abertas pela borda mesentérica, fixadas em pedaços de isopor e acondicionadas em líquido fixador (formol 10%) por período de 24h, em seguida foram lavadas em água corrente e álcool etílico 70% para retirada do fixador e, posteriormente, desidratadas em série crescente de álcoois (70 a 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

Para estudo da estrutura do sistema digestório, foram confeccionadas duas lâminas para cada amostra colhida. A microtomia das mesmas, foi efetuada na espessura de $5\mu\text{m}$, sendo realizados de 6 a 8 cortes semi-seriados para cada segmento de cada animal e entre um corte e o subsequente utilizado, foram desprezados aproximadamente 12 cortes. A coloração dos cortes foi realizada pela técnica de hematoxilina de Harris-eosina, segundo Behmer et al. (1976).

As leituras das lâminas histológicas foram realizadas em microscópio de luz acoplado a um sistema para captura de imagens e sistema analisador de imagens (Leica), para avaliar a altura das vilosidades (AV) e a profundidade das criptas (PC), sendo realizadas 30 leituras de AV e de PC de cada segmento do intestino. De posse dos resultados de AV e PC, foi determinada a relação AV:PC.

Para avaliação da densidade de vilosidades, foram colhidas amostras de $\pm 1,5$ cm das porções proximais do duodeno e do jejuno, que foram lavadas em solução tampão fosfato (0,1M e pH 7,4) e fixadas em glutaraldeído. Após esse procedimento, as amostras foram lavadas várias vezes com tampão fosfato e em seguida, foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, secas em secador de ponto crítico usando CO_2 , montadas sobre suporte de cobre de um centímetro de diâmetro, utilizando-se fita adesiva metálica e, em seguida, foram observadas e elétrôn-

micrografadas em microscópio eletrônico de varredura. Foram realizadas elétron-micrografias de cinco áreas de cada amostra, para estimar a densidade das vilosidades (número das vilosidades/mm²).

Os dados de altura das vilosidades, profundidade das criptas, relação altura das vilosidades: profundidade das criptas e densidade das vilosidades no duodeno e no jejuno foram submetidos à análise de variância utilizando o pacote estatístico SAS (1998).

3. Resultados e discussão

3.1. Experimento I

O valor de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras de mucosa intestinal do duodeno e do jejuno dos leitões no dia zero (-18,02 e -17,95‰, respectivamente), observado antes da troca de alimentação, foi semelhante ao da ração das matrizes (-16,14‰). Caldara et al. (2010) verificaram que a mucosa intestinal de leitões, abatidos no dia do desmame ($\delta^{13}\text{C} = -18,89‰$) apresentaram valores similares ao da ração fornecida ($\delta^{13}\text{C} = -18,87‰$) e ao leite das matrizes ($\delta^{13}\text{C} = -19,26‰$). Esses resultados confirmaram os relatos de Deniro e Epstein (1978) de que as células do organismo animal são isotopicamente semelhantes ao do alimento que consome.

Os resultados do comportamento do *turnover* e valores de meia-vida ($T_{50\%}$) e da substituição de 99% ($t_{99\%}$) do carbono na mucosa do duodeno e do jejuno de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, em função das dietas fornecidas depois do desmame, encontram-se na Tabela 4 e nas Figuras 1 e 2. O Apêndice A demonstra os valores do

sinal isotópico médio ($\delta^{13}\text{C}$) e o desvio padrão das mucosas intestinais do duodeno e jejuno em seus respectivos dias de abate.

Tabela 4. Valores de meia-vida ($T_{50\%}$) e troca de 99% ($t_{99\%}$) dos isótopos estáveis do ^{13}C do duodeno e jejuno de leitões.

Segmento	Diets							
	Controle		Glutamina		Glutamato		Nucleotídeos	
	$T_{50\%}$	$t_{99\%}$	$T_{50\%}$	$t_{99\%}$	$T_{50\%}$	$t_{99\%}$	$T_{50\%}$	$t_{99\%}$
Duodeno	7,3	48,3	7,6	50,6	6,2	41,1	5,2	34,6
Jejuno	7,1	47,0	6,7	44,3	6,2	41,5	4,9	32,6

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ da mucosa intestinal do duodeno e jejuno durante a fase experimental indicaram que o período experimental de 49 dias foi suficiente para que o $\delta^{13}\text{C}$ tecidual atingisse o patamar de equilíbrio isotópico, uma vez que o valor isotópico de carbono médio das rações fornecidas aos leitões durante o período experimental foi de -26,97‰.

A ordem decrescente de meia-vida ($T_{50\%}$) e troca de 99% ($t_{99\%}$) do carbono na mucosa do duodeno dos leitões (Figura 1) foi a seguinte: animais alimentados com dieta contendo 1% de glutamina ($T_{50\%} = 7,6$ e $t_{99\%} = 50,6$ dias), dieta controle ($T_{50\%} = 7,3$ e $t_{99\%} = 48,3$ dias), dieta contendo 1% de glutamato ($T_{50\%} = 6,2$ e $t_{99\%} = 41,1$ dias) e dieta contendo 1% de nucleotídeos ($T_{50\%} = 5,2$ e $t_{99\%} = 34,6$ dias). Para o jejuno (Figura 2) os animais que receberam a dieta controle tiveram maior tempo de troca do que aqueles alimentados com as demais dietas, onde os valores de $T_{50\%}$ do carbono foram os seguintes: 7,1; 6,7; 6,2 e 4,9 dias, enquanto os valores de $t_{99\%}$ do carbono foram: 47,0; 44,3; 41,5; 32,6 dias, respectivamente, para os leitões que receberam dieta controle,

dieta contendo 1% de glutamina, dieta contendo 1% de glutamato e dieta contendo 1% de nucleotídeos.

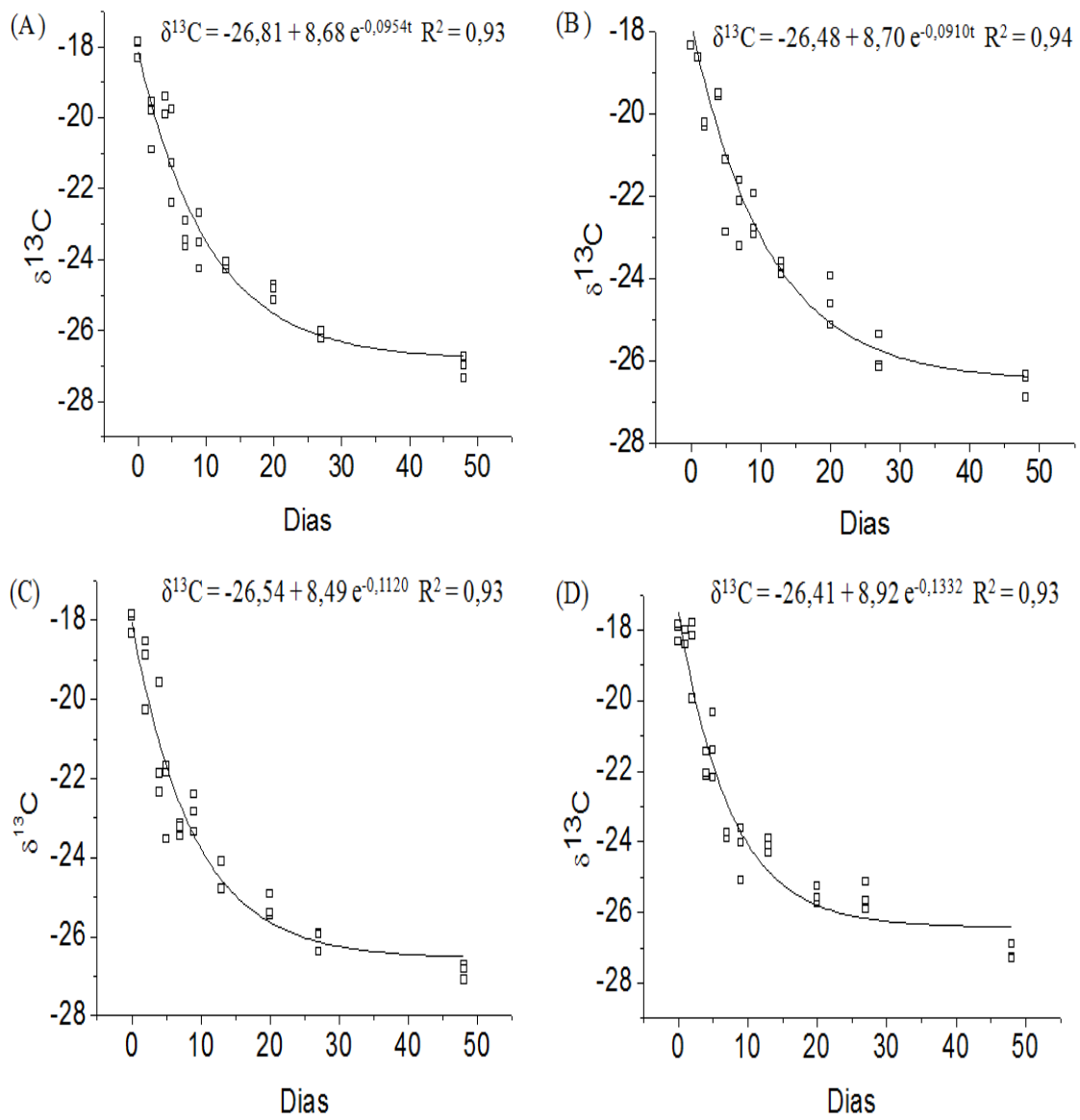


Figura 1. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do duodeno de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).

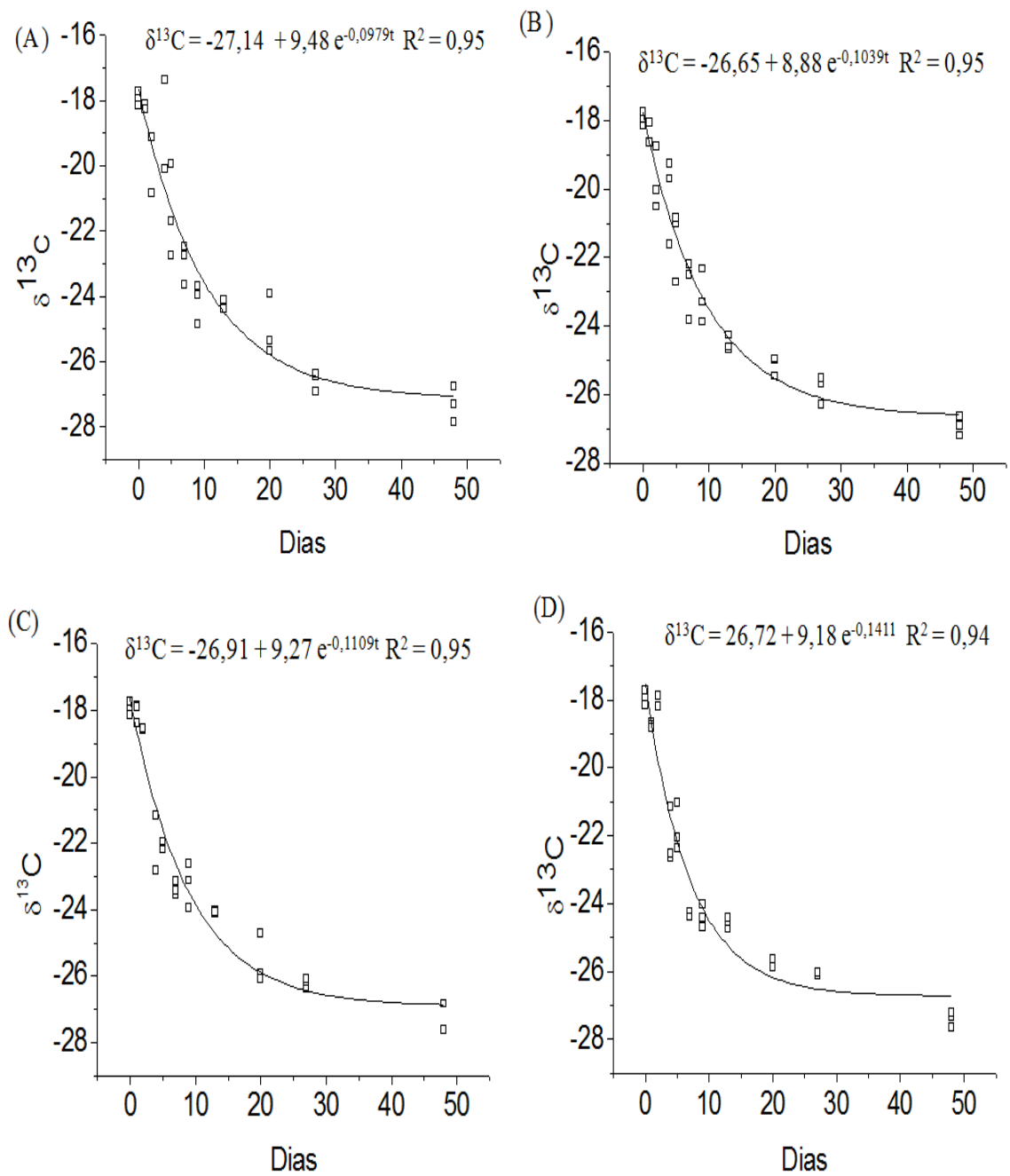


Figura 2. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do jejuno de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).

Apesar de a glutamina ser um aminoácido que influencia a velocidade de *turnover* do carbono nos tecidos (CALDARA et al., 2010), tal ocorrência não foi comprovada na mucosa do duodeno, pois os valores da meia-vida e troca de 99% do carbono foram próximos entre os animais que receberam a dieta controle e aqueles alimentados com dieta contendo glutamina.

A suplementação de glutamina reduz a incidência de morte das células epiteliais do intestino (CHOW e ZHANG, 1998) e previne a atrofia das vilosidades em leitões desmamados precocemente (WU et al., 1996). No entanto, os resultados do presente experimento não sugeriram esse efeito no duodeno, provavelmente pelo fato de terem sido usadas dietas que, além de produto lácteo, também apresentavam óxido de zinco em altas concentrações e ingredientes que também exercem ação trófica na mucosa intestinal de leitões (MOLINO et al., 2011; SHELTON et al., 2011).

Por outro lado, Yi et al. (2002) suplementaram dietas de leitões desmamados com 1,2% de glutamina e não observaram melhora na morfologia do intestino delgado, sugerindo que a glutamina não exerceu ação trófica nessa porção do intestino. Zavarize et al. (2011) não encontraram diferenças no desempenho de frangos de corte alimentados com dietas em que foi ou não adicionada glutamina e atribuíram esse resultado ao fato das dietas terem sido balanceadas com ingredientes de excelente qualidade, o que dificultou a ação da glutamina como melhorador de desempenho.

Além disso, deve ser considerado o fato de que, no presente estudo, os animais foram expostos a baixo desafio imunológico, pois foram mantidos em condição segregada de criação e alojados em instalações que previamente haviam sido submetidas à desinfecção e a período de vazio sanitário, o que pode ter contribuído para

justificar a semelhança do *turnover* do carbono na mucosa intestinal dos leitões alimentados com a dieta controle e a dieta contendo 1% de glutamina.

Alguns estudos demonstraram que, quando leitões desmamados são desafiados imunologicamente, o uso de glutamina na dieta deprime o crescimento de *Escherichia coli* (YU et al., 2002; EWASCHUK et al., 2011), melhora a morfologia intestinal (YU et al., 2002) e aumenta a expressão do mRNA de citocinas na mucosa intestinal.

Os valores da meia-vida do carbono na mucosa intestinal do duodeno foram menores nos animais alimentados com dieta contendo 1% de glutamato ou 1% de nucleotídeos, evidenciando aceleração do processo de incorporação do carbono na mucosa intestinal após o desmame. Dados semelhantes foram encontrados na mucosa do jejuno, pois tanto o glutamato, quanto os nucleotídeos conseguiram influenciar na velocidade de *turnover* do carbono, acelerando o processo de troca, resultando em uma diferença no valor de $T_{99\%}$ do carbono, em relação aos leitões que receberam a dieta controle, de 5,5 e 14,4 dias, respectivamente.

A ação benéfica verificada para o glutamato, provavelmente se deve ao fato de ser o principal combustível oxidativo para as células do intestino (BURRIN e STOLL, 2009), além de ser considerado precursor para outras moléculas biologicamente ativas, incluindo a glutatona, prolina e arginina, que são importantes antioxidantes celulares e compõe glicoproteínas presentes no muco intestinal (WU, 2007).

Reeds et al. (1996) observaram que o glutamato da dieta é substrato oxidativo muito mais importante, nas células, que a glicose proveniente da dieta ou glutamina arterial, e concluíram que a partir de evidências isotópicas, que as células da mucosa não utilizam apenas glutamina extracelular, mas também a sintetizam, tanto na região das criptas como nas vilosidades. Yi e Allee (2006) verificaram que o glutamato,

especialmente o da dieta, pode facilmente substituir a glutamina em diversos dos seus papéis metabólicos, incluindo a geração de energia e a síntese de outros aminoácidos.

As dietas, contendo nucleotídeos, proporcionaram valor de meia-vida do carbono da mucosa intestinal aproximadamente dois dias mais rápido que as demais dietas estudadas. Os nucleotídeos são compostos por base nitrogenada, que compõem as moléculas de DNA e RNA (PIVA et al., 2001), e quando suplementados nas dietas de animais, aumentam a quantidade de bases púricas e pirimídicas, que são essenciais para as células de rápido *turnover* (UAUY et al. 1994; SANDERSON e HE, 1994). Tal fornecimento de bases exógenas acelera a síntese de DNA nas células, podendo auxiliar no crescimento e na recuperação de tecidos. Os nucleotídeos, portanto, podem ter favorecido o fornecimento de bases nitrogenadas para síntese de DNA nas células, aumentando o *turnover* do carbono da mucosa intestinal dos leitões.

3.2. Experimento II

A Tabela 5 apresenta as médias de altura das vilosidades (AV), de profundidade das criptas (PC) e da relação altura das vilosidades:profundidade das criptas (AV:PC) do duodeno e jejuno, em função da idade dos leitões e das dietas.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na AV do duodeno dos leitões com 21 dias, comparado com cada uma das demais idades, enquanto no jejuno a AV dos animais com idade de 21 dias foi menor ($P<0,0001$) em relação àqueles com 42 dias, mas semelhante ($P>0,05$) ao de leitões com 28 ou 35 dias.

Quando foram comparadas as AV do duodeno e do jejuno de leitões com 28, 35 e 42 dias de idade, verificou-se maior altura das vilosidades ($P<0,05$) nos animais aos 42

dias, enquanto entre os leitões com idades de 28 e 35 dias não houve diferenças ($P>0,05$).

Tabela 5. Médias de altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas (PC) e relação altura das vilosidades:profundidade das criptas (AV:PC) do duodeno e jejuno de leitões alimentados com dietas controle (DC), dietas contendo glutamina (DG), dietas contendo glutamato (DAG) e dietas contendo nucleotídeos (DN) aos 21, 28, 35 e 42 dias de idade.

	AV (μm)		PC (μm)		AV:PC	
	Duodeno	Jejuno	Duodeno	Jejuno	Duodeno	Jejuno
Idades (dias)						
21*	282,81	258,30B	129,97B	124,81B	2,17A	2,06A
28	292,31b ¹	250,37Bb	182,91Ab	165,04Bb	1,59Ba	1,53Bab
35	263,47b	247,83Bb	160,14Bb	140,96Bb	1,62Ba	1,63Ba
42	340,12a	360,79Aa	265,20Aa	272,65Aa	1,27Bb	1,31Bb
Significância²	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001
CV³ (%)	20,68	22,43	16,31	16,03	18,8	18,71
Dietas						
DC	313,26	308,97	202,60ab	200,92	1,55	1,56
DG	296,47	269,08	201,21ab	183,9	1,43	1,45
DAG	266,99	287,13	182,60b	200,55	1,55	1,54
DN	317,82	280,14	227,43a	206,05	1,44	1,41
Significância²	NS ⁴	NS	0,0024	NS	NS	NS
Idades x Dietas	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CV (%)	20,17	22,6	14,78	20,18	19,33	16,44

*Médias na coluna seguidas de letras maiúsculas distintas diferem do abate no desmame (21 dias) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

¹Médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Significância para o teste de Tukey entre as idades de abate ou entre as dietas.

³CV: Coeficiente de variação.

⁴NS: Não significativo.

A idade dos leitões influenciou na PC do intestino delgado. No duodeno os animais aos 21 dias apresentaram PC semelhantes ($P>0,05$) ao daqueles com 35 dias, porém, a PC foi maior ($P<0,05$) aos 28 e aos 42 dias, comparado com animais aos 21 dias de idade. Quanto ao jejuno, a PC foi maior aos 42 dias de idade ($P<0,05$) em relação àqueles com 21 dias, mas não foi verificada diferença ($P<0,05$) entre animais com idades de 21 e 28 dias e de 21 e 35 dias. As profundidades das criptas do duodeno e do jejuno, comparado aos animais com idades de 28, 35 e 42 dias, foram superiores ($P<0,0001$) aqueles com 42 dias em relação com 28 e 35 dias de idade, mas foram semelhantes ($P>0,05$) entre os leitões com idades de 28 e 35 dias.

Quanto à relação AV:PC no duodeno e no jejuno, os valores observados no desmame (21 dias) foram maiores ($P<0,05$) comparados com aqueles verificados em cada uma das demais idades. A comparação das relações AV:PC de leitões com 28, 35 e 42 dias de idade demonstrou, para o duodeno, semelhança de valores ($P>0,05$) entre os animais com idades de 28 e de 35 dias. Contudo, ambos foram superiores ($P<0,0001$) ao valor da relação apresentada pelos animais com 42 dias de idade. Quanto ao jejuno, os leitões com 42 dias apresentaram menor relação AV:PC ($P<0,0001$) em relação àqueles com idade de 35 dias, mas não foi verificada diferença ($P>0,05$) entre os animais com idades de 28 e 35 dias.

Durante o aleitamento os leitões apresentam vilosidades intestinais íntegras e bem orientadas, pois nessa fase estão recebendo dieta líquida e de alto valor biológico (CERA et al., 1988; JIANG et al., 2000). No desmame, esses animais sofrem alterações morfofuncionais no intestino, como diminuição da altura das vilosidades e aumento na profundidade das criptas, o que determina imaturidade dos enterócitos (TEIXEIRA et al., 2003). O aprofundamento de criptas está associado à maior atividade mitótica das

células das criptas a fim de renovar as células epiteliais, compensando as perdas nas vilosidades (PLUSKE, 2001). Esses fatos podem justificar os maiores valores da relação AV: PC no duodeno e no jejuno de leitões aos 21 dias de idade.

As mudanças da constituição e forma física da dieta e os fatores estressantes, também contribuem para ocorrência de mudanças funcionais e estruturais dos órgãos que compõem o sistema digestório (CASTILLO-SOTO et al., 2004), de modo que os menores valores de AV e os maiores valores de PC intestinais têm sido verificadas entre cinco a dez dias após o desmame de leitões com 21 ou 28 dias de idade e, a partir daí ocorre recuperação gradativa da mucosa (BERTO et al., 1996; THOMAZ et al., 2011).

As alterações morfológicas esperadas na mucosa intestinal em função do desmame, somente foram parcialmente constatados no presente experimento, pois não foi verificada redução de AV da mucosa intestinal e apenas aumento na PC do duodeno logo após o desmame. Ausência de efeitos da idade nos parâmetros morfométricos do intestino de leitões desmamados também foram verificados por Araujo et al. (2004) e Castillo-Soto et al. (2004).

Aumentos consistentes na PC do duodeno e do jejuno foram verificados aos 42 dias de idade dos leitões, o que ocorreu, provavelmente, para garantir a renovação celular das vilosidades que apresentaram maior altura nessa idade. Entretanto, uma menor relação AV:PC foi observada aos 42 dias de idade. Com seis semanas de idade os leitões já estão aptos a digerir e aproveitar mais facilmente a dieta fornecida, favorecendo o desenvolvimento das vilosidades, conforme foi comprovado por vários autores (XU et al., 2000; PLUSKE, 2001) e demonstrado no presente estudo.

A adição de glutamina, glutamato e nucleotídeos nas dietas de leitões desmamados não alterou ($P > 0,05$) a AV no duodeno e jejuno, PC no jejuno e a relação

AV:PC no jejuno. Resultados semelhantes foram encontrados por Kitt et al.(2002) para AV, com a inclusão de glutamina, por Lee et al. (2007) para morfologia intestinal, com a adição de nucleotídeos e por Abreu et al. (2010) para AV, PC e AV:PC, com a inclusão de glutamina e nucleotídeos nas rações de leitões desmamados.

A dieta com nucleotídeos resultou em maior PC ($P<0,05$) no duodeno em relação a dieta contendo glutamato. Para os animais que receberam a dieta controle, contendo glutamina ou glutamato, as PC no duodeno foram semelhantes ($P>0,05$). Dell'Orto et al. (2002) verificaram efeito benéfico dos nucleotídeos na integridade das células intestinais de leitões recém-desmamados com aumento significativo no número de células das criptas, o que pode justificar o maior aprofundamento das mesmas. Foi comprovado, no presente experimento, que a dieta contendo nucleotídeos teve maior aceleração do *turnover* do ^{13}C na mucosa do duodeno e jejuno de leitões, sugerindo maior taxa de multiplicação das células.

Apesar da glutamina e do glutamato serem combustíveis para as células epiteliais intestinais (REEDS e BURRIN, 2001; WU et al., 2007), não foi observada diferença nas variáveis estudadas entre os animais alimentados com a dieta controle ou contendo glutamina e glutamato, entretanto, o glutamato acelerou o *turnover* do carbono na mucosa intestinal, o que possivelmente comprova sua ação trófica no intestino dos leitões.

Alguns estudos, entretanto, demonstraram vantagens da suplementação com glutamato e nucleotídeos nas dietas de leitões desmamados. Ewtushik et al. (2000) relataram que dieta suplementada com 6,51% de glutamato evitou a atrofia das vilosidades do duodeno de leitões desmamados precocemente. Sauer et al. (2011) verificaram que a suplementação com nucleotídeos dietéticos tem efeitos benéficos

sobre a recuperação intestinal após desafio imunológico e na resposta imune em situações patológicas diversas.

As médias de densidade das vilosidades (número das vilosidades/mm²) do duodeno e jejuno, em função da idade dos leitões e das dietas, são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Médias da densidade das vilosidades (número das vilosidades/mm²) do duodeno e jejuno de leitões alimentados com dietas controle (DC), dietas contendo glutamina (DG), dietas contendo glutamato (DAG) e dietas contendo nucleotídeos (DN) aos 21, 28, 35 e 42 dias de idade.

Efeitos	Densidade das vilosidades (nº vilosidades/mm ²)	
	Duodeno	Jejuno
Idades (dias)		
21*	64,20A	57,00
28	44,05Ba ¹	51,85a
35	44,15Ba	52,75a
42	28,05Bb	37,95b
Significância²	<0,0001	<0,0001
CV³ (%)	29,54	22,15
Dietas		
DC	39,60	43,93
DG	38,67	50,47
DAG	37,06	47,26
DN	37,00	49,93
Significância²	NS ⁴	NS
Interação	NS	NS
CV (%)	26,84	22,79

*Médias na coluna seguidas de letras maiúsculas distintas diferem do abate no desmame (21 dias) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

¹Médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Significância para o teste de Tukey entre as idades de abate ou entre as dietas.

³CV: Coeficiente de variação.

⁴NS: Não significativo.

Foi observada maior densidade das vilosidades ($P < 0,05$) no duodeno dos leitões no desmame (21 dias de idade), quando comparado com as idades de 28, 35 ou 42 dias. Entretanto, para o jejuno não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre o dia de desmame (21 dias de idade) e as demais idades. Redução na densidade das vilosidades no intestino delgado aos 28 dias de idade foi encontrada por Budiño et al. (2005) e Scandolera et al. (2005), quando desmamaram leitões com idades de 21 dias.

Quando foram comparadas as idades de 28, 35 e 42 dias, observou-se menor quantidade das vilosidades por mm^2 com a idade de 42 dias ($P < 0,0001$), no duodeno e jejuno, mas não houve diferença entre 28 e 35 dias de idade, o que pode estar relacionado ao aumento no diâmetro médio dos vilos que ocorre com o avanço da idade após o desmame dos leitões (TUCCI et al., 2011).

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na densidade das vilosidades entre animais que receberam as dietas contendo glutamina, glutamato e nucleotídeos. Apesar do glutamato e dos nucleotídeos terem demonstrado efeitos tróficos na mucosa intestinal e funcionarem como combustível para as células do intestino delgado, aumentando o *turnover* do ^{13}C nos segmentos intestinais, não foram capazes de modificar a densidade das vilosidades no duodeno e no jejuno. Tucci et al. (2011), também, não verificaram efeito da adição de agentes tróficos (glutamina, ácidos graxos poli-insaturados e da parede celular de levedura) na dieta de leitões sobre a densidade de vilosidades.

4. Conclusão

Embora a glutamina não tenha evidenciado sua ação, a inclusão de 1% de nucleotídeos ou de 1% de glutamato nas dietas de leitões acelera o *turnover* do carbono

das mucosas do duodeno e do jejuno, sugerindo sua recuperação mais rápida no período pós-desmame.

Nenhum efeito consistente da ação dos produtos avaliados foi comprovado pelos resultados das análises morfométricas realizadas, indicando que a técnica do *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) pode ser uma ferramenta importante nos estudos sobre a ação trófica de aditivos na mucosa intestinal de leitões.

5. Referências

ABREU, M. L. T. et al. Glutamina, nucleotídeos e plasma suíno em rações para leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 520-525, 2010.

ARAÚJO L. F. et al. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1576-1581, 2006.

AVATO, P. et al. Allylsulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. **Phytomedicine**, Jena, v. 7, p. 239-243, 2000.

BEHMER, O. A.; De TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976, 241p.

BERTO, D. A. et al. Efeitos do tipo de ração inicial sobre a morfologia intestinal e digestibilidade dos nutrientes em leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 25, n. 5, 1996.

BUDIÑO, F. E. L. et al. Effect of probiotic and, or prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 921-929, 2005.

BURRIN, D. G.; STOLL, B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 90, p. 850–856, 2009.

CALDARA, F. R. et al. Glutamina e *turnover* do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 12, p. 2664-2669, 2010.

CASTILLO-SOTO, W. L. et al. Efeito da substituição do farelo de soja pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte protéica em dietas para leitões desmamados sobre a morfologia intestinal e atividade das enzimas digestivas intestinais. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Maracaibo, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2004.

CERA, K. R. et al. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. p. 574-584, 1988.

CHOW, A.; ZHANG, R. Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 1296-1301, 1998.

DELL'ORTO, V.; GIANCAMILLO, D. I.; SAVOINI, A. Influence of nucleotides and glutamine dietary supplementation on gut health of weanling piglets. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 1, p. 220, 2002.

DENIRO, M. L.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, suplemento especial, p. 01-10, 2007.

EWASCHUK, J. B. et al. Glutamine supplementation improves intestinal barrier function in a weaned piglet model of Escherichia coli infection. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 106, p. 870-877, 2011.

EWTUSHIK, A. L.; BERTOLO, R. F. P.; BALL, R. O. Intestinal development of early-weaned piglets receiving diets supplemented with selected amino acids or polyamines. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 80, p. 653-662, 2000.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. **The Condor**, Berkeley, v. 94, p. 181-188, 1992.

JIANG R. et al. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early-weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 1, p. 21-26, 2000.

KITT, S. J. et al. Effects of glutamine on growth performance and small intestine villus height in weanling pigs. **Nebraska Swine Reports**, Nebraska, p. 29-32, 2002.

LEE, D.N.; LIU, S.R.; CHEN, Y.T. et al. Effects of diets supplemented with organic acids and nucleotides on growth, immune responses and digestive tract development in weaned pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.91, n.11-1, p.508-518, 2007.

MOLINO, J. P. et al. Lactose levels in diets for piglets weaned at 21 days of age. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 6, p. 1233-1241, 2011.

MORÉS, N. et al. Estudo ecopatológico sobre problemas e leitões lactentes em criações no sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.47, n.4, p.549-559, 1995.

OVERLAND, M. et al. Effect of dietary formats on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, p. 1875-1884, 2000.

PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K.E.; LINDBERG, J.E. 2001. Glutamine in gut metabolism. In: **Gut environment of pigs**, p.260

PLUSKE, J. R. **Morphological and functional changes in the small intestine of the newly weaned pig**. In: PIVA, A.; KNUDSEN, K.E.B.; LINDBERG, J.E. Gut environment of pigs. Nottingham: University Press, 2001. p.1-27.

REEDS, P. J. et al. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 270, p. 413–418, 1996.

REEDS, P. J. et al. Intestinal glutamate metabolism. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 978-982, 2000.

REEDS, P. J.; BURRIN, D. G. Glutamine and the Bowel. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 2505–2508, 2001.

RHOADS, J. M.; WU, G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino Acids**, v. 37, p. 111–122, 2009.

RODWELL, V. W.; KENNELLY, P. J. **Structures e functions of proteins e enzymes**. In. Harper's Illustrated Biochemistry, 26 ed., 2003, 291p.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição dos alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed., Viçosa: UFV, 2011, 252p.

SANDERSON, I. R.; HE, Y. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, Cambridge, Bethesda, v. 124, Supl.1, p. 131-137, 1994.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistic** – Cary: Institute, 1998.

SAUER, N.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The role of dietary nucleotides in single-stomached animals. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, p. 46-59, 2011.

SCANDOLERA, J. S. et al. Efeitos de fontes protéicas na dieta sobre a morfologia intestinal e o desenvolvimento pancreático de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2355-2368, 2005.

SHELTON, N. W. et al. Effects of copper sulfate, tri-basic copper chloride, and zinc oxide on weanling pig performance. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 89, p. 2440-2451, 2011.

TEIXEIRA, A. O. et al. Efeito de dietas simples e complexas sobre a morfo-fisiologia gastrintestinal de leitões até 35 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 926-934, 2003.

THOMAZ, M. C. et al. Plasma suíno e ovo inteiro em rações de leitões desmamados sobre a estrutura e ultra-estrutura da mucosa intestinal. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 246-254, 2011.

TUCCI, F. M. et al. Efeito da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado e sobre o desempenho. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n.4, p. 931-940, 2011.

UAUY, R.; QUAN, R.; GIL, A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. **The Journal of Nutrition**, Bethasda, v. 124, p. 1436-1441, 1994.

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

WU, G. 2007. Papéis importantes da glutamina na nutrição e produção animal. **Aminogut® Ciência e Prática na Nutrição de Leitões** (Boletim Especial Ajinomoto), Texas, p.7-9.

XU, R. J.; WANG, F.; ZHANG, S. H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 66, p. 95-107, 2000.

YI, G. F. et al. 2002. Impact of glutamine, glutamate, and nucleotide on the growth performance and intestinal morphology of weaned piglets. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80 p. 198. (Abstr.).

YI, G. F.; ALLEE, G. L. **Revisão de literatura: Glutamina (Gln) e Glutamato (Glu)**. 2006. Disponível em: <<http://www.lisina.com.br>>. Acesso em: 28 jun 2012.

ZAVARIZE, K. C. et al. Glutamina e nucleotídeos na dieta de frangos de corte criados no sistema alternativo. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, p. 913-920, 2011.

CAPÍTULO 3

**Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos do *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em
órgãos de leitões desmamados**

**Efeito da glutamina, glutamato e nucleotídeos do *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em
órgãos de leitões desmamados**

RESUMO - No desmame, ocorrem alterações morfológicas e fisiológicas no sistema digestório de leitões, comprometendo o desempenho e a capacidade de resposta imunológica. Foi realizado um experimento com o objetivo de verificar a influência da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos no *turnover* do carbono no pâncreas, fígado, baço e rim de leitões desmamados aos 21 dias de idade. Foram avaliadas quatro dietas: sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (DC); com 1% de glutamina (DG); com 1% de glutamato (DAG) e com 1% de nucleotídeos (DN). Foram utilizados 123 leitões, sendo abatidos três animais no dia 0 e três animais de cada uma das dietas nos dias 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 20, 27 e 49 após o desmame, para coleta de amostras dos órgãos, que foram analisadas quanto à composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e mensurada a velocidade de substituição do ^{13}C no tempo. Os valores da meia-vida do carbono para o pâncreas foram de 14,0; 13,4; 12,0 e 10,5 dias, para o fígado de 8,0; 10,0; 7,1 e 7,4 dias, para o baço de 15,1; 16,6; 15,0 e 14,0 dias e para o rim de 15,3; 15,2; 13,1 e 12,6 dias, respectivamente, para os leitões que receberam DC, DG, DAG e DN. A inclusão de nucleotídeos na dieta acelerou o *turnover* do ^{13}C no pâncreas, baço e rim, enquanto que fígado, foi observado *turnover* mais rápido quando os leitões foram alimentados com a dieta contendo glutamato e nucleotídeos. A técnica de estudo com diluição isotópica do ^{13}C nos órgãos dos sistemas digestório e imune possibilita demonstrar as ações tróficas do glutamato e nucleotídeos nesses órgãos.

Palavras-chave: baço, fígado, isótopos estáveis, pâncreas, suínos

Effect of glutamine, glutamate and nucleotides turnover of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) in organs of weaned piglets

ABSTRACT - At weaning, morphological and physiological changes may occur in digestive system piglets, which may depress performance and the immunological capacity. An experiment was conducted in order to study the effect of dietary glutamine, glutamate and nucleotides on carbon turnover in the pancreas, liver, spleen and kidney of 21 d-weaned pigs. Four diets without glutamine, glutamate and nucleotides (DC) with 1% of glutamine (DG) with 1% of glutamate (DAG) and with 1% of nucleotides (DN). One hundred twenty three piglets were used, three of them were slaughtered at day 0 and other three on days 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 20, 27 and 49, to collect samples of organs for ^{13}C isotope composition analysis and were measured the isotopic composition $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ and ^{13}C time replacement. The values of carbon half-life to the pancreas were 14.00, 13.43, 11.99 and 10.45 day, to the liver were 8.03, 10.00, 7.08 and 7.38 day, to the spleen were 15.40, 16.62, 15.00 and 13.97 day, and to the kidney were 15.30, 15.17, 13.13 and 12.64 day, respectively, for the piglets fed DC, DG, DAG and DN, respectively. The nucleotides inclusion in the diet accelerated the ^{13}C turnover in the pancreas, spleen and kidney. In the liver, faster ^{13}C turnover was observed when the piglets were fed the diets containing glutamate and nucleotides. The technique of ^{13}C isotope dilution in organs of digestive and immune systems, allows to demonstrate the trophic actions of glutamate and nucleotides in these organs.

Keywords: liver, pancreas, pigs, spleen, stable isotopes

1. Introdução

Nos últimos anos, visando atender a crescente demanda por proteína animal no Brasil e no mundo, o aumento na produção de carne tem ocorrido principalmente em função da melhora na eficiência de produção nas criações. Dentro desse contexto, a suinocultura se destaca, pois produz a carne mais consumida no mundo.

Como uma das formas de melhorar a produtividade nas granjas tecnificadas, os leitões são desmamados precocemente. Nessas condições, o desmame é caracterizado como prática de manejo crítica na suinocultura, pois o leitão jovem possui sistemas imune e digestório ainda em desenvolvimento, com baixa atividade das enzimas pancreáticas e intestinais específicas para digestão de alimentos de origem vegetal (EGGUM, 1995) e baixa produção de ácido clorídrico no estômago (PROHÁSZKA e BARÓN, 1987), reduzindo seu desempenho no período pós-desmame e predispondo os animais a problemas digestivos.

A nutrição adequada do leitão desmamado, portanto, é imprescindível, o que exige do produtor a garantia de fornecer dietas de alta digestibilidade e com quantidades adequadas de nutrientes, para que os leitões atinjam bons índices produtivos. O rápido desenvolvimento do trato gastrintestinal, após o desmame, é essencial para a redução dos problemas enfrentados nesta fase e, conseqüentemente, para que possam expressar seu alto potencial genético.

Desse modo, o fornecimento de aditivos que favoreçam o desenvolvimento dos órgãos digestivos torna-se importante aliado na busca de melhores resultados zootécnicos. Vários estudos têm avaliado a utilização de glutamina, glutamato e nucleotídeos nas dietas de leitões recém-desmamados, (WU et al., 1996; WU et al., 2010; SAUER et al., 2012), visando melhorias nas respostas fisiológica e humoral

desses animais, de modo a serem usados como possíveis substitutos dos antimicrobianos melhoradores de desempenho, uma vez que a proibição desses aditivos para essa finalidade vem crescendo na produção animal.

Atualmente, as pesquisas em nutrição animal buscam novas metodologias e um exemplo é a técnica dos isótopos estáveis, que pode ser útil em estudos de fisiologia e nutrição animal, uma vez que possibilita medir a taxa de substituição (*turnover*) do carbono tecidual que é influenciada por fatores ambientais, nutricionais e sanitários (CARRIJO et al., 2000).

Hobson e Clark (1992) observaram que as composições isotópicas do ^{13}C dos tecidos de animais geralmente assemelham-se às suas dietas. Desse modo, esses traçadores vêm sendo utilizados com eficácia em vários estudos com peixes (ZUANON et al., 2007), frangos de corte (CARRIJO et al., 2006), galinhas de postura (DENADAI et al., 2006), codornas de corte (MÓRI et al., 2008), suínos (CALDARA et al., 2008) e outras espécies animais, visando avaliar as taxas de *turnover* de constituintes do corpo animal e/ou rastrear a utilização de subprodutos de origem animal na alimentação.

Em função dos problemas enfrentados pelos leitões no desmame, o objetivo do presente trabalho foi verificar a influência da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos no *turnover* do carbono no pâncreas, fígado, baço e rins de leitões desmamados aos 21 dias de idade.

2. Material e métodos

O projeto de pesquisa, conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, foi submetido e aprovado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), dessa instituição sob o protocolo n. 32/2011 – CEUA.

Foram utilizados 123 leitões desmamados, de linhagem comercial, machos castrados e fêmeas, que foram alojados em sala de creche em baias metálicas suspensas de 1,0 x 1,75 m. As baias eram compostas por piso parcialmente ripado e equipadas com comedouros, bebedouros tipo chupeta e campânula de aquecimento. O controle da temperatura interna da sala de creche foi realizado com a regulagem das cortinas laterais e com o manejo das campânulas de aquecimento.

A partir do desmame (idade média de 21 dias) até os 70 dias de idade, foram alimentados à vontade dentro do programa de alimentação por fases, de modo a atender as exigências nutricionais, de acordo com Rostagno et al. (2011), nas seguintes fases: pré-inicial I dos 21 aos 35 dias, pré-inicial II dos 36 aos 49 dias e inicial dos 50 aos 70 dias de idade.

Os tratamentos avaliados foram: Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle - DC); Dietas contendo 1% de glutamina (DG); Dietas contendo 1% de glutamato (DAG) e Dietas contendo 1% de nucleotídeos (DN).

A principal fonte energética das rações foi a quirera de arroz, matéria prima oriunda de planta do ciclo fotossintético C₃, para que apresentassem sinal isotópico de ¹³C distinto das dietas fornecidas às matrizes, cujas rações de gestação e de lactação possuíam como fonte energética principal o milho que é uma planta de ciclo fotossintético C₄. As composições percentuais e valores nutricionais calculados das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais, estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, e na Tabela 3 são mostrados os valores do sinal isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) da dieta fornecida para as matrizes em lactação e dos leitões desmamados.

Tabela 1. Composição percentual das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.

Ingredientes, %	Dietas pré-iniciais I				Dietas pré- iniciais II				Dietas iniciais			
	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN
Arroz, quirera	57,41	56,41	56,41	56,41	60,51	59,51	59,51	59,51	64,25	63,25	63,25	63,25
Soja, farelo 46	20,00	20,00	20,00	20,00	25,00	25,00	25,00	25,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Concentrado proteico de soro de leite	6,80	6,80	6,80	6,80	3,70	3,70	3,70	3,70	-	-	-	-
Maltodextrina	6,66	6,66	6,66	6,66	3,17	3,17	3,17	3,17	-	-	-	-
Farelo do glúten de milho 60%	2,60	2,60	2,60	2,60	1,69	1,69	1,69	1,69	1,30	1,30	1,30	1,30
Óleo de Soja	1,48	1,48	1,48	1,48	1,53	1,53	1,53	1,53	1,50	1,50	1,50	1,50
Glutamina (99%)	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-
Glutamato (98,5%)	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-
Nucleotídeos ¹ (97%)	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00
Fosfato bicálcico	1,25	1,25	1,25	1,25	1,50	1,50	1,50	1,50	1,23	1,23	1,23	1,23
Calcário calcítico	1,03	1,03	1,03	1,03	0,90	0,90	0,90	0,90	0,83	0,83	0,83	0,83
Cloreto de sódio	0,59	0,59	0,59	0,59	0,62	0,62	0,62	0,62	0,46	0,46	0,46	0,46
L-Lisina HCl (78,4%)	0,77	0,77	0,77	0,77	0,55	0,55	0,55	0,55	0,09	0,09	0,09	0,09
DL-Metionina (99%)	0,23	0,23	0,23	0,23	0,21	0,21	0,21	0,21	-	-	-	-
L-Treonina (98%)	0,31	0,31	0,31	0,31	0,22	0,22	0,22	0,22	-	-	-	-
L-Triptofano (99%)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	0,02	0,02	0,02	-	-	-	-
L-Valina (96,5%)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,03	0,03	0,03	0,03	-	-	-	-
Óxido de zinco (77%)	0,34	0,34	0,34	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de colina (60%)	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Antioxidante BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix mineral ²	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico ³	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Edulcorante ⁴	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

¹ 5'-Inosinato dissódico e 5'-guanilato dissódico.

² Premix mineral suprimindo as seguintes quantidades por kg de ração: Ferro - 40 mg, Cobre - 35 mg, Manganês - 20 mg, Zinco - 40 mg, Cobalto - 0,36 mg, Iodo - 0,84 mg, Selênio - 0,12 mg;

³ Premix vitamínico suprimindo as seguintes quantidades por kg de ração: Vit. A - 25000 UI, Vit. D3 - 5000 UI, Biotina - 5 mg, Niacina - 10 mg, Pantotenato de cálcio - 30 mg, Vit. B12 - 70 µg, Vit. B2 - 18 mg, Vit. E - 75 mg, Vit. K3 - 1 mg;

⁴ Composto por sacarina sódica, neoespiridina e dióxido de silício.

Tabela 2. Composição nutricional calculada das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais.

	Dietas pré-iniciais I				Dietas pré- iniciais II				Dietas iniciais			
	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN	DC	DG	DAG	DN
EM (kcal/kg)	3400	3400	3400	3400	3383	3383	3383	3383	3370	3370	3370	3370
PB (%)	19,00	19,00	19,00	19,00	19,55	19,55	19,55	19,55	19,90	19,90	19,90	19,90
Lisina dig. (%)	1,45	1,45	1,45	1,45	1,33	1,33	1,33	1,33	1,01	1,01	1,01	1,01
Metionina dig. (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,50	0,50	0,50	0,50	0,31	0,31	0,31	0,31
Valina dis. (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	0,92	0,92	0,92	0,92	0,20	0,20	0,20	0,20
Treonina dig. (%)	0,91	0,91	0,91	0,91	0,84	0,84	0,84	0,84	0,64	0,64	0,64	0,64
Triptofano dig. (%)	0,26	0,26	0,26	0,26	0,24	0,24	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23
Lactose (%)	10,00	10,00	10,00	10,00	5,01	5,01	5,01	5,01	-	-	-	-
Cálcio (%)	0,82	0,82	0,82	0,82	0,83	0,83	0,83	0,83	0,72	0,72	0,72	0,72
Fósforo disp. (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,34	0,34	0,34	0,34

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos. Considerando os valores nutricionais dos ingredientes propostos por ROSTAGNO et al. (2011).

Tabela 3. Valores do sinal isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas fornecidas para as matrizes em lactação e para os leitões desmamados.

Dietas	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Lactação	-16,14
Pré-inicial I	
DC	-26,86
DG	-26,44
DAG	-26,76
DN	-29,02
Pré-inicial II	
DC	-27,11
DG	-27,76
DAG	-26,14
DN	-27,30
Inicial	
DC	-27,46
DG	-28,10
DAG	-28,87
DN	-27,17

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro tratamentos, (dietas apresentadas na Tabela 1). Nos dias 1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 20, 27 e 49 após o desmame, foram abatidos, após insensibilização elétrica, três leitões por tratamento. No dia do desmame (dia zero) também foram abatidos três leitões, com o objetivo expressar a composição isotópica dos tecidos, que até então era função da ração fornecida às matrizes nas fases de gestação e de lactação. As coletas foram concentradas nos primeiros dias do período experimental devido a maior velocidade na diluição isotópica do ^{13}C nos tecidos durante essa fase (HOBSON e CLARK, 1992).

Após insensibilização elétrica e abate, o ventre dos animais foi aberto e as vísceras retiradas. Com o auxílio de pinças e tesouras, foram colhidas amostras da parte inicial do pâncreas (cabeça), do lobo esquerdo do fígado e da parte mediana do baço e do rim direito, que foram lavados com água deionizada e acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e imediatamente congeladas (-18°C), até a sua preparação para as análises isotópicas.

Para a realização das análises isotópicas dos órgãos, as amostras foram previamente descongeladas e secas estufa de circulação forçada a 56°C , por 24 horas. Como a fração lipídica pode ocasionar fracionamento isotópico de até 5‰ nos valores de ^{13}C (PIASANTIER et al., 2003), as amostras foram desengorduradas com éter etílico P.A., à temperatura de 65°C , por 4 horas. As amostras foram colocadas em um frasco de plástico e cada material e moídas por 5 minutos em alta rotação (9700 rpm) em moinho criogênico a -190°C , com o objetivo de obter material homogêneo, com aspecto microscópico. Após a moagem, todas as amostras foram pesadas (50 a 70 μg) dentro de capsulas de estanho e posteriormente analisadas.

Para determinação da composição isotópica das amostras, foi utilizado o espectrômetro de massas (Delta S-Finnigan Mat) acoplado ao Analisador Elemental (EA 1108-CHN-Fisons Instruments) do centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociência da UNESP, Câmpus Botucatu. Os resultados foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão internacional Peedee Belemnite (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{amostra, padrão}) = [(R \text{ amostra}/R\text{padrão}) - 1] \times 10^3, \text{ onde:}$$

$\delta^{13}\text{C}$ é o enriquecimento da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão (Adimensional);

R = razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão (Adimensional);

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nas amostras, foi empregada a função exponencial do tempo, de acordo com Ducatti et al. (2002) expressa pela equação:

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)] e^{-kt}, \text{ onde:}$$

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t) (Adimensional);

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final (Adimensional);

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial (Adimensional);

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹;

t = tempo (em dias) desde a substituição da ração.

A meia-vida ($T_{50\%}$) do carbono na mucosa intestinal nos tratamentos, em $t = T$, foi calculada pela equação:

$$T_{50\%} = \ln 2/k$$

O tempo total ($t_{95\%}$) necessário para que ocorra a substituição dos átomos iniciais pelos átomos finais pode ser determinada pela equação:

$$t_{95\%} = (-1/k) \ln(1-F), \text{ onde:}$$

$t_{95\%}$ = 95% de substituição dos átomos iniciais pelos finais, unidade: tempo (dias);

\ln = logaritmo neperiano;

F = valor de átomos trocados, que pode variar de zero a 0,95;

k = constante de *turnover*, unidade: dia^{-1} , fornecendo uma ideia de “velocidade” no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (DUCATTI et al., 2002; DUCATTI, 2007).

Os dados das análises isotópicas foram analisados pelo método de equações exponenciais de primeira ordem do software Minitab®16.

3. Resultados e discussão

Os resultados do comportamento do *turnover* e valores de meia-vida ($T_{50\%}$) e da substituição de 95% ($t_{95\%}$) do ^{13}C nos órgãos, pâncreas, fígado, baço e rins, de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, em função das dietas fornecidas depois do desmame, encontram-se na Tabela 4 e nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os apêndices B e C apresentam os valores do sinal isotópico médio ($\delta^{13}\text{C}$) e o desvio padrão, dos órgãos pâncreas, fígado, baço e rins em seus respectivos dias de abate.

Tabela 4. Valores de meia-vida ($T_{50\%}$) e troca de 95% ($t_{95\%}$) dos isótopos estáveis do ^{13}C do pâncreas, fígado, baço e rim de leitões.

Segmento	Dietas							
	Controle		Glutamina		Glutamato		Nucleotídeos	
	$T_{50\%}$	$t_{95\%}$	$T_{50\%}$	$t_{95\%}$	$T_{50\%}$	$t_{95\%}$	$T_{50\%}$	$t_{95\%}$
Pâncreas	14,0	60,5	13,4	58,1	12,0	51,8	10,5	45,2
Fígado	8,0	34,7	10,0	43,2	7,1	30,6	7,4	31,9
Baço	15,1	65,1	16,6	71,8	15,0	64,8	14,0	60,4
Rim	15,3	66,1	15,2	65,6	13,1	56,7	12,6	54,7

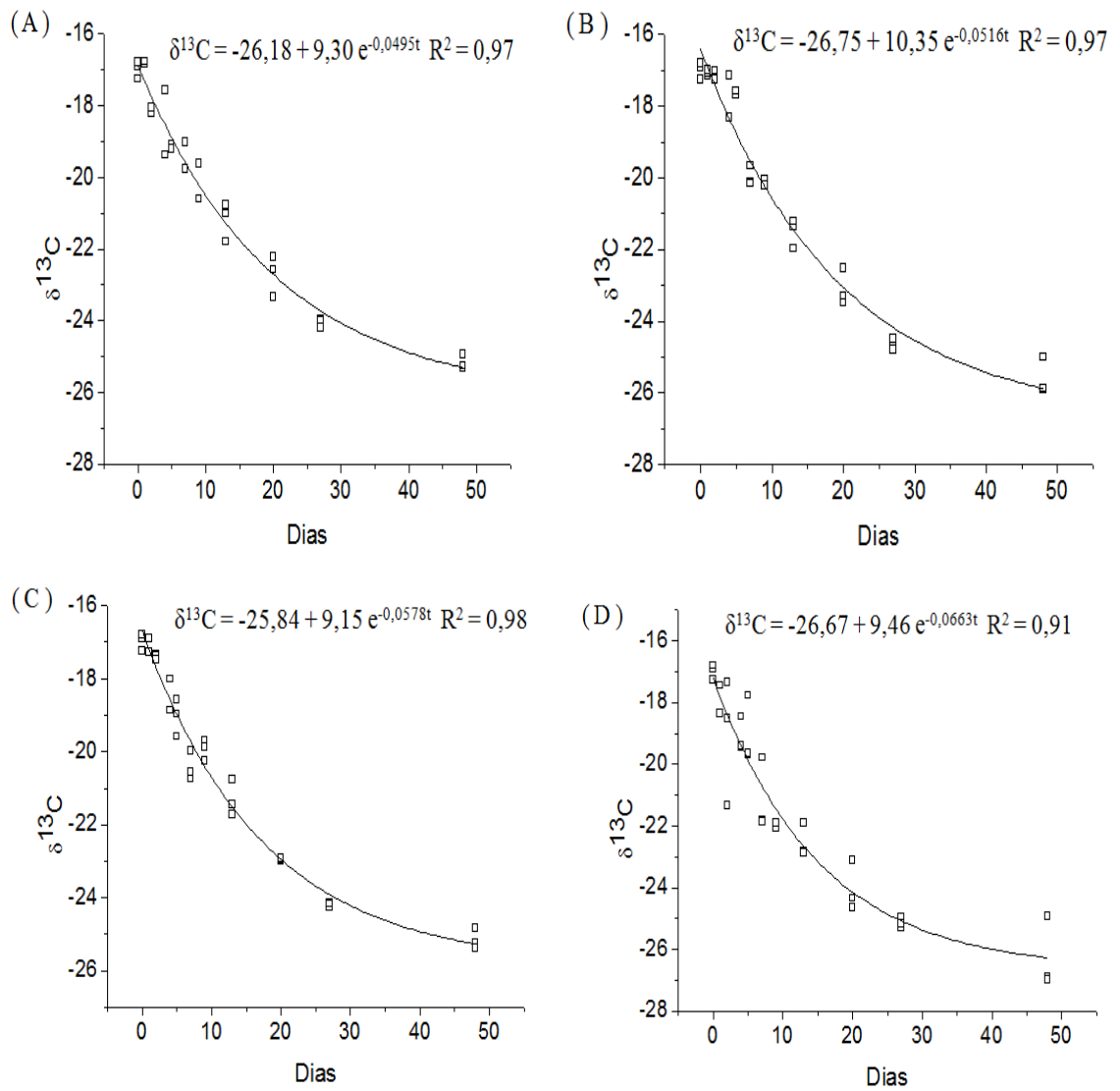


Figura 1. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do pâncreas de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).

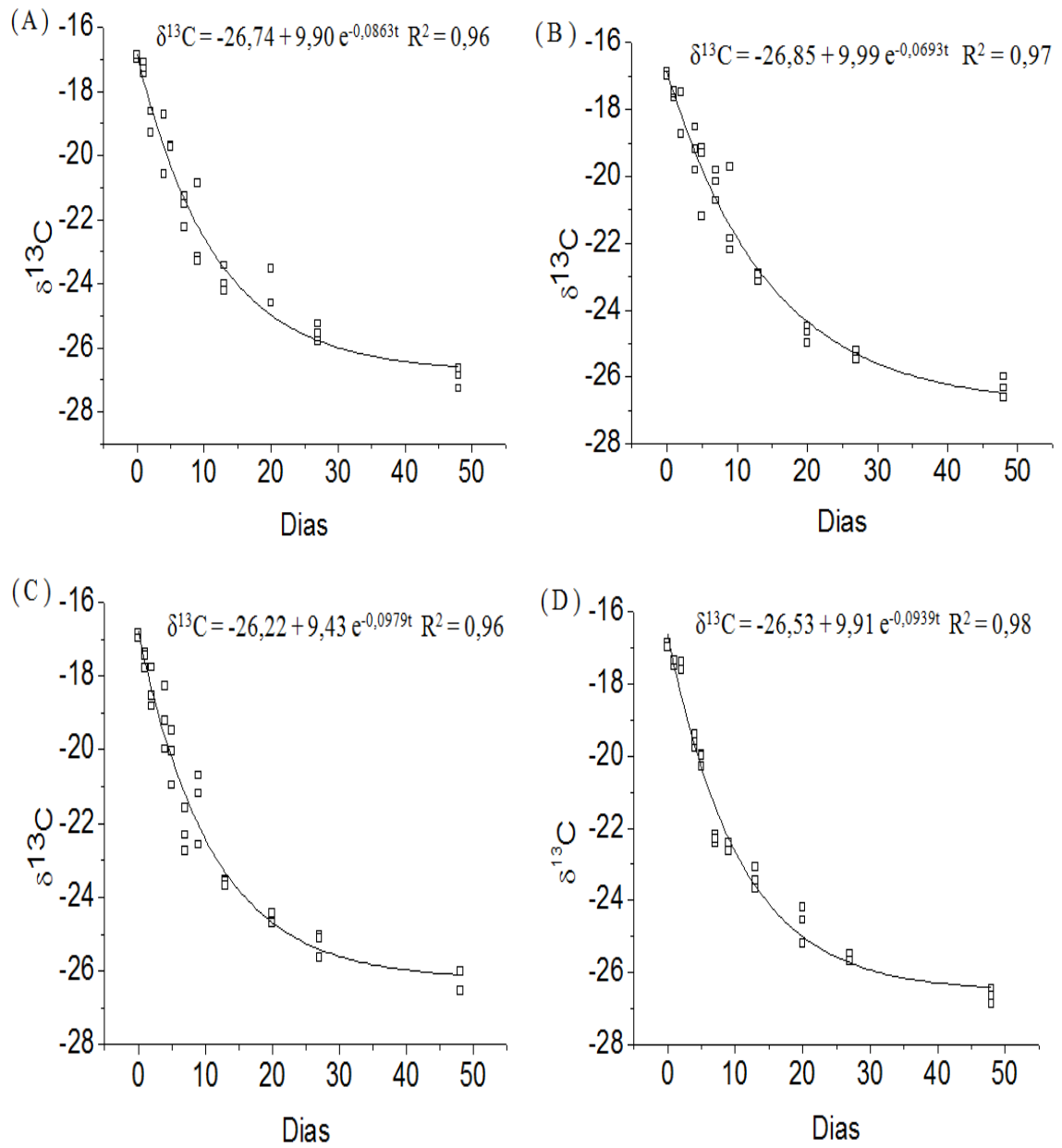


Figura 2. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do fígado de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).

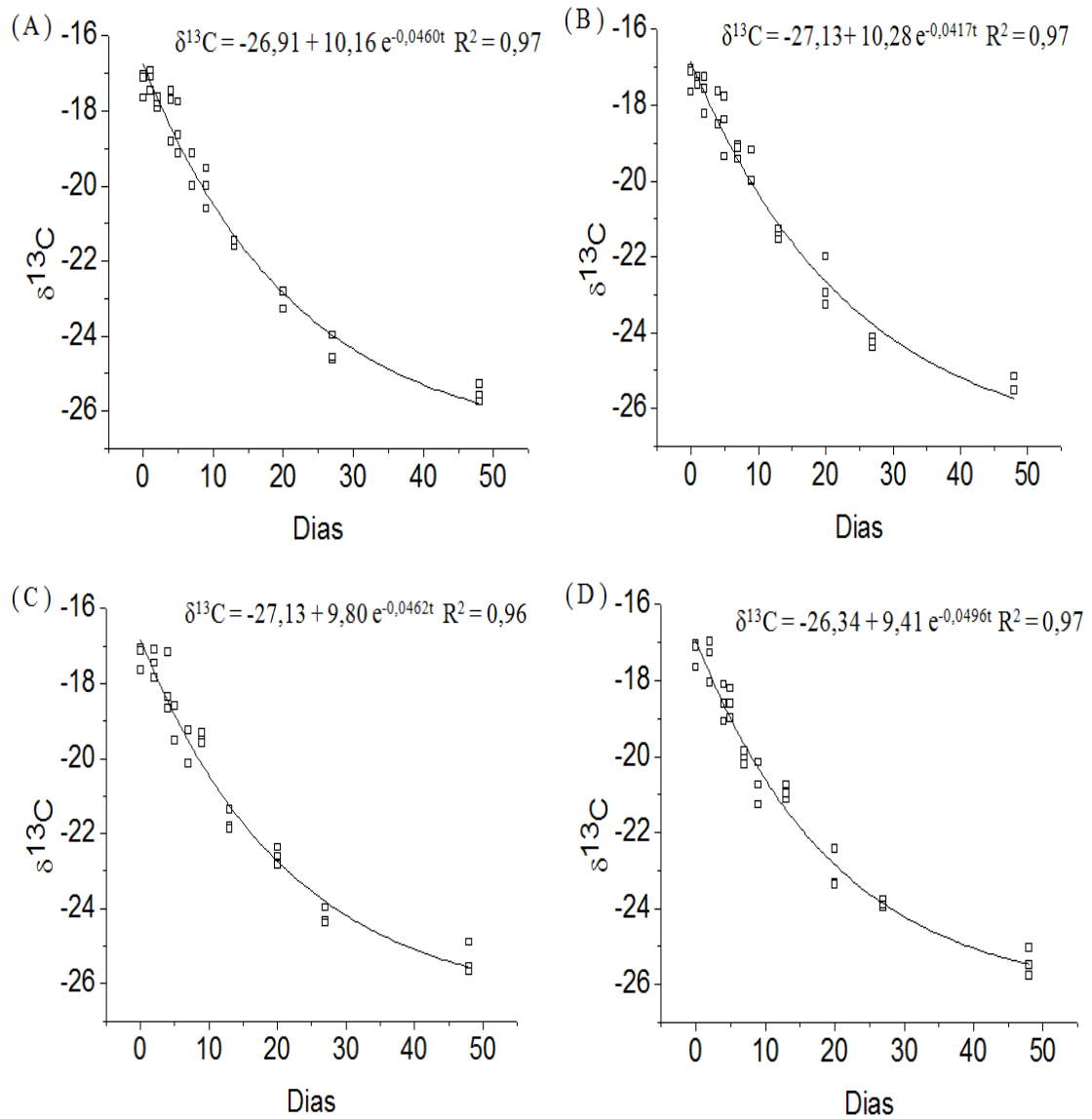


Figura 3. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do baço de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).

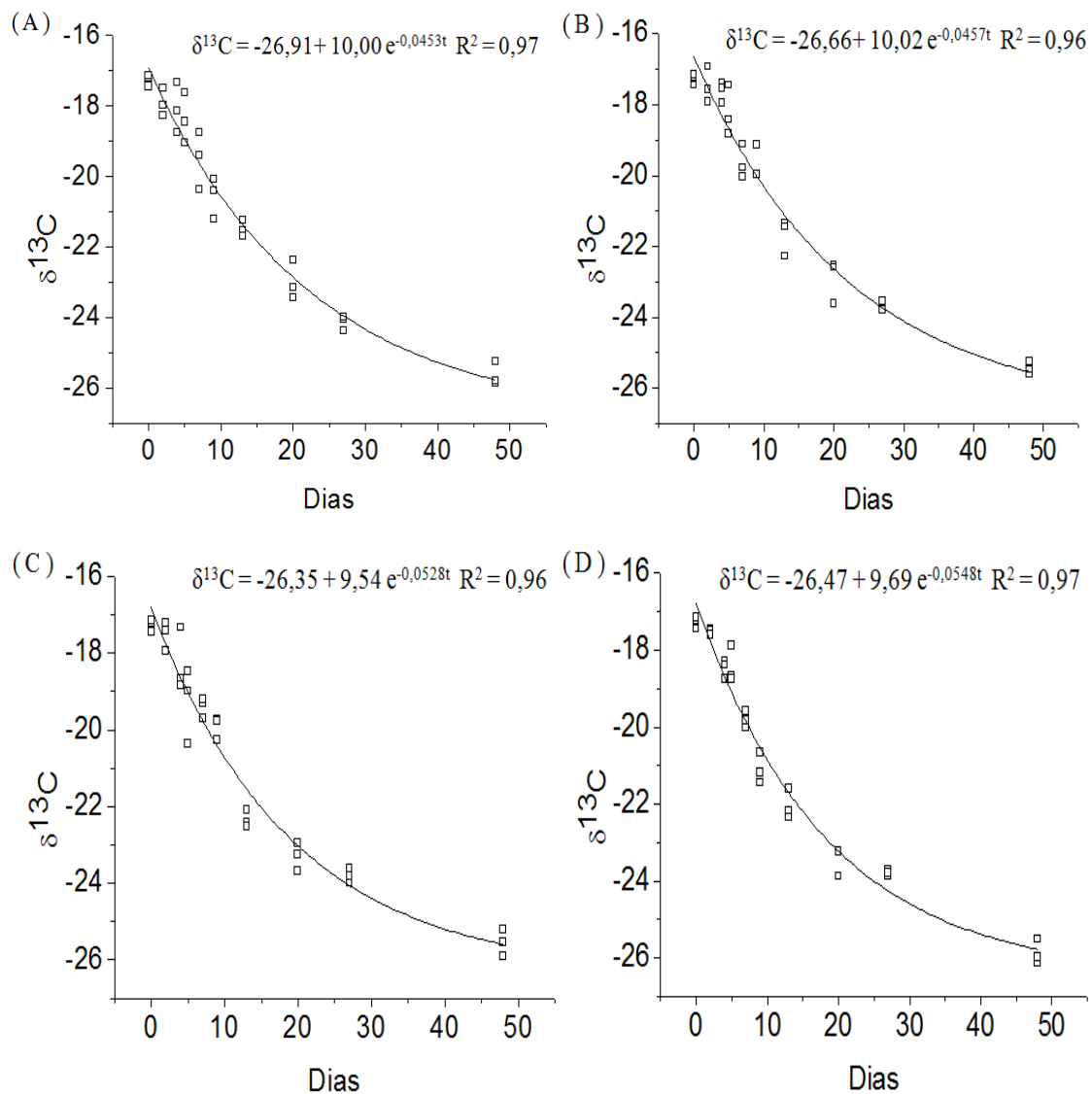


Figura 4. Ajuste dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do rim de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com dietas controle (A), dietas contendo 1% de glutamina (B), dietas contendo 1% de glutamato (C) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (D).

Ocorreu rápida incorporação do ^{13}C da dieta contendo nucleotídeos no pâncreas, sendo que com 10,5 dias foi alcançado o valor da meia-vida e substituição de 95% com 45,2 dias do ^{13}C . Os valores de meia vida do carbono foram de 14,0; 13,4 e 12,0 dias e de 95% de substituição foram de 60,5; 58,1 e 51,8 dias para os leitões

alimentados com as dietas controle, contendo glutamina e glutamato, respectivamente (Tabela 4 e Figura 1).

A representação das equações exponenciais do peso de leitões dos 21 aos 35 dias e dos 21 aos 70 dias de idade, em função das dietas após o desmame, encontra-se nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

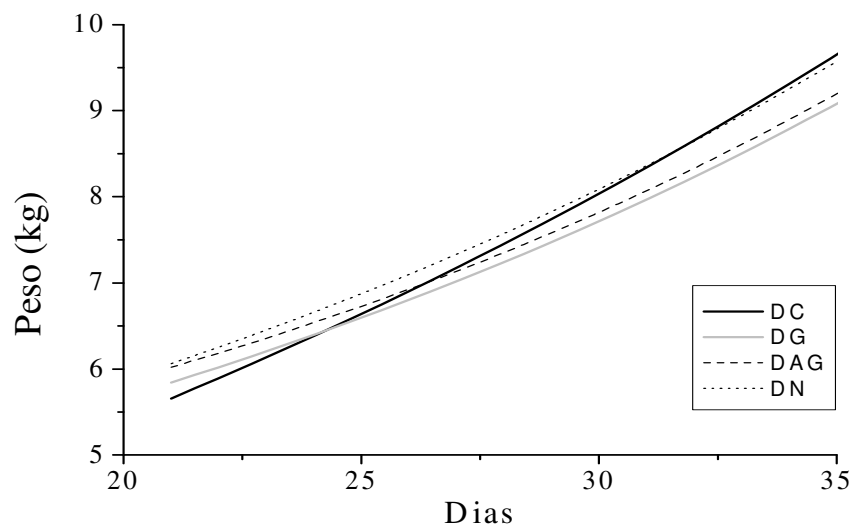


Figura 5. Representação das equações exponenciais do peso de leitões dos 21 aos 35 dias de idade, alimentados com as dietas controle (DC), dietas contendo 1% de glutamina (DG), dietas contendo 1% de glutamato (DAG) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (DC).

O peso do pâncreas pode representar mudanças na capacidade digestiva do animal, pela alta correlação entre o seu peso e a atividade das enzimas pancreáticas (CORLESS e SELL, 1999). Apesar de não ter sido mensurado o peso do pâncreas, os aditivos avaliados, principalmente o glutamato e os nucleotídeos, podem ter propiciado condições que favoreceram a ação das enzimas produzidas e que atuam no lúmen

intestinal e influenciado o tempo de *turnover* do carbono do pâncreas. De acordo com as Figuras 5 e 6, pode-se inferir que as dietas contendo glutamato e nucleotídeos proporcionaram melhor crescimento dos animais e, conseqüentemente, maior crescimento do pâncreas, acelerando a incorporação do ^{13}C nesse órgão.

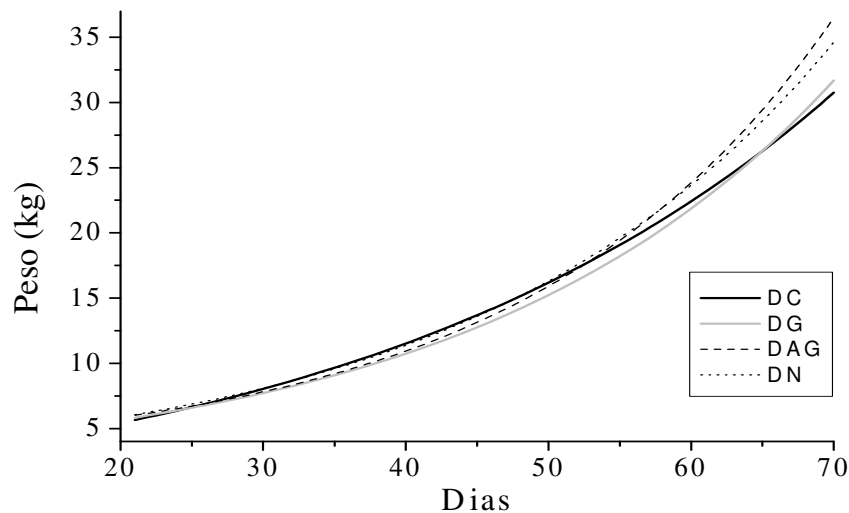


Figura 6. Representação das equações exponenciais do peso de leitões dos 21 aos 70 dias de idade, alimentados com as dietas controle (DC), dietas contendo 1% de glutamina (DG), dietas contendo 1% de glutamato (DAG) e dietas contendo 1% de nucleotídeos (DN).

Jiang et al. (2009) e Sauer et al. (2012) comprovaram que a adição de glutamina, glutamato e de nucleotídeos nas dietas de leitões recém-desmamados, pode desempenhar papel importante na manutenção da integridade intestinal, resultando em melhora nos processos de digestão e absorção de nutrientes.

No fígado (Figura 2) a incorporação do ^{13}C da dieta contendo glutamato ou nucleotídeos foi mais rápida, com tempo de meia-vida do carbono de sete dias, aproximadamente, enquanto que com a dieta controle e com aquela contendo glutamina,

os valores de meia vida do carbono foram de 8,0 e 10,0, respectivamente. Para a troca de 95% de substituição do ^{13}C foram de 34,7; 43,2; 30,6 e 31,9 para as dietas controle, glutamina, glutamato e nucleotídeos, respectivamente.

Caldara et al. (2008) estudaram a influência da glutamina no *turnover* do ^{13}C do pâncreas e fígado de leitões recém-desmamados, observando aumento na velocidade de substituição do carbono, em função da suplementação com glutamina, em ambos os órgãos avaliados, concluindo que houve estímulo anabólico da glutamina. Entretanto, no presente trabalho, não foi observada aceleração do *turnover* do ^{13}C com o fornecimento da dieta contendo glutamina, pois foi a que proporcionou troca mais lenta do carbono no fígado em relação às demais dietas.

A troca mais rápida do ^{13}C no fígado foi verificada com o consumo da dieta com glutamato seguida da dieta contendo nucleotídeos. O glutamato tem ação única no metabolismo, para degradação de aminoácidos nos hepatócitos e na desaminação do glutamato, que libera seu grupo amino como amônia, que se converte em amônio e vai para o ciclo da ureia. Esta reação ocorre principalmente nos hepatócitos (RODWELL, 1998), o que pode ter contribuído para a aceleração do *turnover* do ^{13}C no órgão dos leitões alimentados com dieta contendo glutamato. A inclusão de nucleotídeos na dieta pode promover o crescimento e a regeneração dos hepatócitos (CARVER, 1994) e assim proporcionar maior peso relativo do fígado nos leitões (GARCIA, 2007).

O *turnover* do ^{13}C no fígado dos leitões que receberam dieta contendo glutamina foi mais lento ($T_{50\%} = 10$ dias e $t_{95\%} = 43,2$), o que sugeriu que pode ter ocorrido maior preservação dos hepatócitos ou mesmo menor taxa de crescimento desse órgão, tendo em vista que o ritmo de crescimento dos leitões que receberam dieta contendo

glutamina foi inferior nas primeiras semanas pós-desmame, comparado com os animais alimentados com as demais dietas (Figuras 5 e 6).

Os valores de meia vida e substituição de 95% do carbono mostraram que a incorporação do ^{13}C no baço foi mais lenta que nos outros órgãos estudados, sendo a dieta com nucleotídeos a que proporcionou *turnover* mais rápido do ^{13}C , com valor de meia-vida de 14,0 dias e substituição de 95% de 60,4 dias (Tabela 4). Esse resultado sugeriu que a adição de nucleotídeos nas dietas de leitões pode auxiliar no desenvolvimento da capacidade de resposta imune, pois o baço é um órgão importante do sistema imune.

Carver (1994) relatou que a adição de nucleotídeos, em dietas para ratos, ativa os macrófagos e proporciona maior produção de interleucina-2, além disso, Andrade et al. (2011) verificaram aumento no peso relativo do baço de leitões alimentados com diferentes níveis de nucleotídeos e relataram que esse aumento pode ser associado ao possível estímulo do sistema imune. Os animais que consumiram dieta contendo nucleotídeos tiveram ritmo de crescimento maior em relação aos animais alimentados com a dieta controle ou contendo glutamina (Figuras 5 e 6), o que também pode ter contribuído para refletir no tamanho relativo do baço e influenciar na velocidade de troca do carbono no órgão.

Para os leitões alimentados com as demais dietas os valores de meia-vida e de 95% de substituição do carbono no baço foram próximos, ou seja, de 15,1, 16,6 e 15,0 dias e 65,1; 71,8 e 64,8 dias para aqueles que receberam dietas controle, com glutamina e com glutamato, respectivamente. Hernandez et al. (2000) verificaram que a inclusão de glutamina na dieta de leitões desmamados infectados com *Escherichia coli* proporcionou aumento na concentração de anticorpos (IgG), entretanto, no presente

estudo houve pouca imposição de desafio aos animais, pois foram criados em condições de segregação sanitária.

No rim (Tabela 4 e Figura 4), observou-se que a incorporação do ^{13}C foi mais rápida quando os leitões receberam as dietas contendo nucleotídeos e glutamato, com valores de meia vida e 95% de substituição do carbono de 12,6 e 13,1 dias e 56,7 e 54,7 dias, respectivamente. Os valores da meia vida e de 95% de substituição do ^{13}C foram de 15,2 e 15,3 dias e 65,6 e 66,1, para os animais que receberam as dietas contendo glutamina e dieta controle, respectivamente.

Os rins são um dos principais órgãos relacionados ao metabolismo do nitrogênio, exercendo papel importante na regulação dos níveis de aminoácidos no plasma (CHEN et al., 1995). Garcia (2007), trabalhando com leitões recém-desmamados, não observou efeito dos níveis de nucleotídeos nas dietas sobre o peso relativo do rim. Entretanto, no presente estudo, houve uma troca mais rápida do ^{13}C do rim dos animais alimentados com dieta contendo nucleotídeos e glutamato, o que talvez também esteja relacionado com o maior crescimento corporal (Figuras 5 e 6) e, conseqüentemente, maior crescimento dos rins dos leitões que receberam esses aditivos nas dietas.

A glutamina desempenha papel essencial, na manutenção e na função de várias células e órgãos, tal como os rins (CONJARD et al., 2002), sendo que a glutamina sintetase é imprescindível para o controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo (ATKINSON e CAMIEN, 1982). Entretanto, a suplementação da glutamina não influenciou a troca de ^{13}C desse órgão.

A glutamina, glutamato e nucleotídeos desencadeiam maiores respostas em tecidos animais de rápido *turnover*, (Van BUREN e FREDERICK et al. 2007; RHOADS e WU, 2009) e para animais em estado catabólico, como ocorre com leitões

recém-desmamados, esses aditivos podem se tornar importantes componentes dietéticos para a manutenção e regeneração dos órgãos (FOX et al., 1988 e CARVER, 1999).

A manutenção da integridade e o adequado desenvolvimento dos órgãos principalmente aqueles relacionados com os sistemas digestório e imune são importantes, principalmente para os leitões recém-desmamados, e os aditivos estudados, especialmente o glutamato e os nucleotídeos, demonstraram potencial de exercerem esses efeitos.

4. Conclusão

A técnica de estudo com diluição isotópica do ^{13}C nos órgãos, principalmente relacionados com os sistemas digestório e imune, possibilita demonstrar as ações tróficas do glutamato e nucleotídeos nesses órgãos.

5. Referências

ANDRADE, C. et al. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 4, p. 788-796, 2011.

ATKINSON, D. E.; CAMIEN, M. N. The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH. **Current topics in cellular regulation**, Orlando, v. 21, p. 261-302, 1982.

CALDARA, F. R. et al. Efeito da glutamina sobre o *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de músculos e vísceras de leitões desmamados: glutamina e *turnover* de carbono tecidual. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 3, n. 3, p. 291-297, 2008.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, p. 209-218, 2000.

CARRIJO, A. S. et al. Traceability of bovine meat and bone meal and bone meal in poultry by stable isotope analyses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, p. 37-42, 2006.

CARVER, J. D. Dietary Nucleotides: Cellular Immune, Intestinal and Hepatic System Effects. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, (Suppl 1), p. 148-144, 1994.

CARVER, J. D. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. **Acta Pediatric Supplement**, Florida, v. 430, p. 83-88, 1999.

CHEN, H. Y. et al. Changes in plasma urea concentration can be used to determine protein requirements of two populations of pigs with different protein accretion ration. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 9, p. 261-2639, 1995.

CONJARD, A.; BRUN, V.; MARTIN, M. Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. **Biochemical Journal**, London, v. 368, p. 301-308, 2002.

CORLESS, A. B.; SELL, J. L. The effects of delayed access to feed and water on the physical and functional development of the digestive system of young turkeys. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, p. 1158-1169, 1999.

DENADAI, J. C. et al. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 251-256, 2006.

DUCATTI, C. et al. 2002. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007. 204 p. Apostila.

EGGUM, B. O. The influence of dietary fiber on protein digestion and utilization in monogastrics. **Archives of Animal Nutrition**, Colchester, v. 48, p. 89-95, 1995.

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

GARCIA, A. Nucleotídeos como potenciais promotores do crescimento de leitões recém-desmamados. 2007. 40f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba.

HERNANDEZ, J. et al. Glutamine stimulates the synthesis of immunoglobulin IgG in infected early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, p. 175, 2000.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. **The Condor**, Berkeley, v. 94, p. 181-188, 1992.

JIANG, Z. Y. et al. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, p. 4050–4056, 2009.

MÓRI, C. et al. Poultry offal meal traceability in meat quail tissues using the technique of stable carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) isotopes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 10, p. 45-52, 2008.

PIASSENTIER, E. et al. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, Amsterdam, v. 64, n. 33, p. 239-247, 2003.

PROHASZKA, L.; BARÓN, F. he predisposing role of high dietary protein supplies in enteropathogenic *E. coli* infections of weaned pigs. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Budapeste, v. 27, n. 3, p. 222-232, 1987.

REEDS, P. J. et al. Intestinal glutamate metabolism. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 978-982, 2000.

RHOADS, J. M.; WU, G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino Acids**, v. 37 p. 111–122, 2009.

RODWELL, V. W. **Catabolismo dos esqueletos de carbono dos aminoácidos**. In: HARPER: Bioquímica . 8 ed. São Paulo, 1998, 860p.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**: composição dos alimentos e exigências nutricionais. 3. ed., Viçosa: UFV, 2011, 252p.

VAN BUREN, C. T.; FREDERICK, R. Dietary Nucleotides: A Conditional Requirement. **Nutrition**, New York, v. 13, n. 5, p. 470-472, 2007.

SAUER, N. et al. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 90, p. 3126–3134, 2012.

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

WU, G. et al. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 88, p. 195–204, 2010.

ZUANON, J. A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C. et al. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed on C₃- or C₄- cycle plants grain-based diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 147, p. 761-765, 2007.

CAPÍTULO 4

Implicações

Implicações

Como consequência do desmame, a dieta dos leitões normalmente sofre grande mudança, pois o leite é substituído por dieta sólida, predispondo-os a estresse de ordem nutricional, resultando em comprometimento na ingestão de alimento e, conseqüentemente, redução na altura das vilosidades, associada ou não, ao aumento na profundidade das criptas, influenciando negativamente a capacidade de digestão.

O emprego de técnicas de morfometria e de microscopia de varredura têm sido comuns em estudos, para avaliar a resposta dos leitões produzidos com suposta ação trófica na mucosa intestinal, contudo, os resultados dessas pesquisas nem sempre são conclusivos, o que pode estar relacionado com a dificuldade de preservar a qualidade da mucosa intestinal durante as etapas de coleta e processamento das amostras.

No presente estudo, foi possível demonstrar que como consequência do desmame, ocorreu aprofundamento das criptas, redução da relação altura das vilosidades:profundidade das criptas e da densidade das vilosidades aos 28 e 35 dias de idade. Esses resultados são indicativos que os leitões sofreram alterações morfofuncionais na mucosa intestinal em função do desmame, entretanto, quando comparadas essas variáveis, entre os animais que receberam as dietas controle, contendo glutamina, contendo glutamato e contendo nucleotídeos, em épocas distintas de abate, não foram observadas diferenças.

A técnica dos isótopos estáveis na avaliação do *turnover* do carbono vem fornecendo subsídios para o entendimento de uma série de mecanismos fisiológicos, buscando complementar as técnicas tradicionais. Essa, por sua vez, demonstrou ser efetiva também nesse estudo, pois foi capaz de evidenciar a ação trófica principalmente do glutamato e de nucleotídeos, nos tecidos corporais dos leitões.

A manutenção da integridade e o adequado desenvolvimento dos órgãos relacionados com os sistemas digestório e imune são importantes, principalmente para os leitões recém-desmamados. No caso específico da mucosa do intestino delgado, a presença de glutamato e de nucleotídeos nas dietas demonstrou ser benéfica, pois garantiu a recuperação mais rápida das injúrias intestinais que ocorrem nos leitões como consequência do desmame.

No presente experimento foram usadas dietas complexas, contendo ingredientes altamente digestíveis como derivados lácteos e o óxido de zinco que também pode exercer ação trófica na mucosa intestinal dos leitões, o que pode justificar o resultado similar de leitões alimentados com dieta controle e com dieta contendo glutamina. Para futuros experimentos, portanto, sugere-se a utilização de dietas menos complexas para avaliação dos aditivos estudados.

APÊNDICES

Apêndice A. Valores do sinal isotópico médio ($\delta^{13}\text{C}$) e o desvio padrão das mucosas intestinais do duodeno e jejuno em seus respectivos dias de abate.

Duodeno								
Abate	DC		DG		DAG		DN	
	Médias	DV¹	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV
0	-18,02	0,20	-18,02	0,20	-18,02	0,20	-18,02	0,20
1	-18,02	0,20	-17,93	0,46	-18,06	0,15	-18,27	0,18
2	-20,08	0,55	-19,44	1,10	-19,23	0,69	-18,64	0,87
4	-19,67	0,26	-19,53	0,03	-21,26	1,13	-21,88	0,29
5	-21,14	0,92	-21,69	0,78	-22,36	0,78	-21,30	0,65
7	-23,32	0,28	-22,30	0,60	-23,28	0,13	-23,81	0,05
9	-23,49	0,53	-22,54	0,41	-22,86	0,32	-24,23	0,56
13	-24,16	0,07	-23,72	0,12	-24,33	0,30	-24,11	0,13
20	-24,89	0,17	-24,55	0,42	-25,25	0,22	-25,53	0,19
27	-26,15	0,09	-25,86	0,34	-26,08	0,21	-25,56	0,30
48	-27,02	0,22	-26,53	0,22	-26,87	0,15	-27,15	0,18

Jejuno								
Abate	DC		DG		DAG		DN	
	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV
0	-17,95	0,14	-17,95	0,14	-17,95	0,14	-17,95	0,14
1	-18,17	0,06	-18,25	0,25	-18,05	0,23	-18,75	0,06
2	-19,99	0,87	-19,76	0,67	-18,56	0,02	-18,04	0,15
4	-18,74	1,36	-20,19	0,95	-22,00	0,82	-22,11	0,64
5	-21,46	1,01	-21,53	0,80	-22,08	0,12	-21,82	0,53
7	-22,97	0,45	-22,85	0,65	-23,38	0,16	-24,31	0,06
9	-24,16	0,45	-23,17	0,56	-23,23	0,47	-24,38	0,25
13	-24,25	0,10	-24,52	0,17	-24,08	0,04	-24,59	0,12
20	-24,98	0,70	-25,14	0,21	-25,58	0,57	-25,75	0,11
27	-26,58	0,22	-25,84	0,31	-26,26	0,12	-26,05	0,04
48	-27,30	0,37	-26,92	0,19	-27,36	0,35	-27,39	0,16

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

¹ DV = Desvio Padrão

Apêndice B. Valores do sinal isotópico médio ($\delta^{13}\text{C}$) e o desvio padrão dos órgãos pâncreas e fígado em seus respectivos dias de abate.

Pâncreas								
Abate	DC		DG		DAG		DN	
	Médias	DV¹	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV
0	-16,99	0,17	-16,99	0,17	-16,99	0,17	-16,99	0,17
1	-16,81	0,03	-17,07	0,05	-17,02	0,16	-17,90	0,45
2	-18,11	0,07	-17,18	0,12	-17,40	0,05	-19,07	1,52
4	-18,48	0,90	-17,73	0,59	-18,44	0,42	-19,11	0,44
5	-19,16	0,04	-17,62	0,05	-19,04	0,36	-19,04	0,85
7	-19,27	0,33	-19,98	0,21	-20,42	0,30	-21,16	0,92
9	-20,11	0,49	-20,14	0,07	-19,94	0,21	-21,99	0,09
13	-21,19	0,40	-21,52	0,30	-21,31	0,36	-22,53	0,42
20	-22,71	0,41	-23,10	0,38	-22,96	0,03	-24,04	0,61
27	-24,05	0,10	-24,66	0,11	-24,18	0,04	-25,15	0,11
48	-25,18	0,16	-25,59	0,39	-25,15	0,21	-26,27	0,90

Fígado								
Abate	DC		DG		DAG		DN	
	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV
0	-16,93	0,05	-16,93	0,05	-16,93	0,05	-16,93	0,05
1	-17,26	0,12	-17,54	0,07	-17,54	0,17	-17,41	0,06
2	-20,22	1,68	-18,32	0,56	-18,38	0,41	-17,49	0,12
4	-18,80	1,19	-19,17	0,44	-19,16	0,58	-19,58	0,14
5	-19,32	0,50	-19,87	0,88	-20,16	0,53	-20,07	0,14
7	-21,67	0,38	-20,24	0,33	-22,21	0,43	-22,30	0,08
9	-22,43	1,04	-21,26	1,03	-21,49	0,73	-22,50	0,09
13	-23,89	0,30	-22,99	0,10	-23,59	0,06	-23,40	0,21
20	-23,66	0,62	-24,71	0,19	-24,54	0,11	-24,64	0,36
27	-25,54	0,19	-25,35	0,10	-25,27	0,26	-25,61	0,09
48	-26,92	0,23	-26,32	0,21	-26,91	0,84	-26,66	0,14

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

¹ DV = Desvio Padrão

Apêndice C. Valores do sinal isotópico médio ($\delta^{13}\text{C}$) e o desvio padrão dos órgãos baço e rim em seus respectivos dias de abate.

Baço								
Abate	DC		DG		DAG		DN	
	Médias	DV¹	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV
0	-17,27	0,25	-17,27	0,25	-17,27	0,25	-17,27	0,25
1	-17,15	0,20	-17,36	0,08	-17,25	0,19	-17,21	0,26
2	-17,79	0,11	-17,69	0,36	-17,47	0,25	-17,43	0,41
4	-17,99	0,55	-18,07	0,44	-18,06	0,60	-18,59	0,33
5	-18,51	0,50	-18,51	0,56	-19,06	0,47	-18,60	0,26
7	-19,43	0,39	-19,20	0,15	-19,83	0,40	-20,04	0,12
9	-20,05	0,38	-19,72	0,36	-19,44	0,10	-20,73	0,37
13	-21,51	0,06	-21,41	0,10	-21,69	0,21	-20,95	0,13
20	-23,04	0,24	-22,74	0,49	-22,60	0,15	-23,05	0,41
27	-24,39	0,28	-24,26	0,09	-24,22	0,17	-23,89	0,06
48	-25,54	0,18	-25,34	0,19	-25,37	0,32	-25,43	0,26
Rim								
Abate	DC		DG		DAG		DN	
	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV	Médias	DV
0	-17,27	0,12	-17,27	0,12	-17,27	0,12	-17,27	0,12
1	-17,50	0,27	-17,34	0,25	-17,32	0,17	-17,41	0,12
2	-17,92	0,29	-17,46	0,36	-17,53	0,28	-17,51	0,06
4	-18,08	0,49	-17,63	0,22	-18,28	0,63	-18,47	0,18
5	-18,37	0,50	-18,23	0,52	-19,28	0,73	-18,43	0,37
7	-19,51	0,57	-19,64	0,35	-19,39	0,20	-19,80	0,14
9	-20,56	0,43	-19,69	0,37	-19,92	0,23	-21,09	0,29
13	-21,50	0,16	-21,69	0,39	-22,34	0,18	-22,04	0,30
20	-22,99	0,40	-22,90	0,47	-23,30	0,25	-23,56	0,31
27	-24,15	0,15	-23,63	0,11	-23,81	0,13	-23,79	0,06
48	-25,63	0,26	-25,45	0,13	-25,56	0,24	-25,86	0,23

DC - Dietas sem glutamina, glutamato e nucleotídeos (controle); DG - Dietas contendo 1% de glutamina; DAG - Dietas contendo 1% de glutamato; DN - Dietas contendo 1% de nucleotídeos.

¹ DV = Desvio Padrão