

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

**AVALIAÇÃO ÓPTICA, ULTRAESTRUTURAL E EXPRESSÃO DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E
ÁCIDO GLUTÂMICO**

ÉDINA DE FÁTIMA AGUIAR

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia, Área de Concentração Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU - SP
Julho – 2014

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

**AVALIAÇÃO ÓPTICA, ULTRAESTRUTURAL E EXPRESSÃO DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E
ÁCIDO GLUTÂMICO**

ÉDINA DE FÁTIMA AGUIAR

Zootecnista

Orientador: Prof. Ariel Antonio Mendes

Co-Orientadora: Prof^ª Márcia Regina Fernandes Boaro Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Zootecnia, Área de concentração Nutrição e Produção Animal.

BOTUCATU - SP
Julho – 2014

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

A282a Aguiar, Édina de Fátima, 1983-
Avaliação óptica, ultraestrutural e expressão de proliferação celular da mucosa entérica de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico / Édina de Fátima Aguiar. - Botucatu : [s.n.], 2014
xv, 108 f. : tabs., fots. color., grafs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014
Orientador: Ariel Antonio Mendes
Coorientador: Márcia Regina Fernandes Boaro Martins
Inclui bibliografia

1. Aminoácidos na nutrição animal. 2. Frango de corte - Nutrição. 3. Intestino delgado. 4. Mucosa intestinal. I. Mendes, Ariel Antonio. II. Martins, Márcia Regina Fernandes Boaro. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Ofereço

À Deus, pelas inúmeras bênçãos derramadas sobre minha vida, por iluminar e guiar meus passos, permitindo que alcance meus objetivos;
À Nossa Senhora Aparecida que sempre me protege e atende meus pedidos

Dedico

Primeiramente aos meus queridos e amados pais, Edivaldo e Maria pela educação, amor, carinho, compreensão e por acreditaram em mim, me dando forças para seguir sempre;

Às minhas irmãs, Elaine e Eliane, pelo apoio e carinho, a meu irmão Evandro (in memoriam) que mesmo distante sei que em algum lugar está torcendo pelo meu sucesso, e à minha sobrinha e afilhada Thainny pelo amor que faz cada dia valer a pena;

Ao meu namorado e companheiro Bruno, pela compreensão e apoio, estando sempre ao meu lado, me incentivando e dando forças para continuar, mesmo nos momentos difíceis.

Agradeco

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Campus de Botucatu, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de doutorado.

À Professora Márcia Regina Fernandes Boaro Martins, pelo incentivo, ensinamentos, amizade e confiança depositada em mim.

Ao Professor Ariel Antônio Mendes pela orientação e apoio durante este tempo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio Financeiro.

À todos os Professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP/Campus de Botucatu, pelos ensinamentos durante todo o curso de doutorado.

Aos Professores Antonio Celso Pezzato, José Roberto Sartori, Edivaldo Antônio Garcia, Margarida Maria Barros e Maria Márcia Pereira Sartori, muito obrigada pela disposição em ajudar, às sugestões, conselhos e ensinamentos.

Aos Professores Rodrigo Garófallo Garcia, Adriano Sakai Okamoto, Hirasilva Borba e José Roberto Sartori pelas sugestões e por participarem da banca avaliadora da defesa do doutorado.

À equipe formada durante este percurso Barbara Cristina da Silva Fernandes, Carolina Bresne, Cristiane Sanfelice, Bruna Boaro Martins, Giovanni Silva Prado e Jônatas Garcia Neiro agradeço muito pela ajuda durante o experimento, por sempre disporem do tempo de vocês para me socorrerem, pelos bons momentos vividos e pelas conversas. Agradeço de coração a cada um.

Ao meu namorado Bruno Biazon, pela valiosa ajuda na condução do experimento.

Às amigas Graciene Conceição dos Santos, Camila Tângari, Michel Farah, Natalia Rincon Beltran, Kauana Kock, Laís Lorena Queiroz, Natalia, Cristiana, Bruna Favetti pela grande amizade, bons momentos de convivência e pelas conversas.

Aos secretários da Pós-Graduação em Zootecnia, Seila Cristina Cassinelli Vieira, Carlos Pazini Junior e a Ellen Casseiro Guilhen, pelos esclarecimentos e apoio.

Às Empresas Mcassab pela doação dos suplementos vitamínico e mineral, e a Tortuga pelo fornecimento de parte dos aminoácidos.

Aos funcionários da FMVZ-UNESP/Botucatu, Carlos Godoy, Odair Vieira, Gilson de Campos, Paulo Inácio Primo, João Nardini, Sr. Pedro Leite, pela valiosa ajuda durante a condução do experimento, pelas boas conversas e amizade em estar sempre dispostos a me ajudar.

Aos funcionários da Supervisão Michel de Castilhos, Luiz Carlos Fioravante, e na Fábrica de Ração Paulo Sérgio dos Santos e Moisés dos Santos (Nico) por toda ajuda durante o experimento com a confecção das rações, pelos bons momentos e amizade adquirida.

Ao Vitor Barbosa Fascina e ao Laboratório de Nutrição de Aves por toda ajuda e apoio.

Aos amigos conquistados durante o curso de doutorado, pelas conversas, risadas, experiências trocadas e companheirismo.

Aos alunos de Graduação em Zootecnia João Victor Feliciano Pereira, Alexandre Cominotte, Bruna Ewely da Silva Petinati e Daniele Martins Rodrigues pela ajuda durante o abate e análises posteriores.

Ao Renato Agostinho Arruda, funcionário da Secretária do Departamento de Produção Animal e ao Luiz Carlos, funcionário do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal pela amizade.

Ao Professor Rinaldo Ortiz, pela ajuda com as análises.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Anatomia, Laboratório de Microrganismos - Bioquímica em especial a Professora Luciana Francisco Fleuri e ao Laboratório de Histologia, em especial o Professor Luis Fernando Barbisan, pela ajuda com as análises e colaboração.

Aos Funcionários do IB/UNESP/ Botucatu, Cristiane Abe, Gelson Rodrigues e Vanda Tofoli pela amizade e pelos bons momentos.

Aos Professores do IB/UNESP/Botucatu, pela atenção e incentivo, e em especial à aluna Beatriz Aparecida Fioruci Fontanelli (Bia) pela amizade e valiosa ajuda nas análises.

À Deus pela vida.

À toda minha família pelas orações, compreensão e apoio nos momentos de ausência.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que por falta minha não foram aqui citados, meu mais sincero agradecimento.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
1. Introdução Geral	2
2. Revisão de Literatura	3
2.1 - Maturação e Desenvolvimento do trato gastrointestinal das aves.....	3
2.2 - Histologia do intestino delgado de frangos de corte.....	5
2.3 - Ação de agentes tróficos sobre a mucosa intestinal das aves.....	7
2.4 - Metabolismo da glutamina e ácido glutâmico no intestino.....	8
2.5 - Interação glutamina, ácido glutâmico e mucosa intestinal.....	11
3. Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2. AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE O DESEMPENHO, BIOMETRIA E MORFOMETRIA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	26
Desempenho das aves.....	29
Biometria Entérica.....	29
Morfometria Intestinal.....	30
Resultados e Discussão.....	32
Desempenho.....	32
Biometria entérica.....	36
Morfometria da parede do intestino delgado.....	39
Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	46

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA INTEGRIDADE INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO.....	50
Resumo.....	51
Abstract.....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	54
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
Microscopia Eletrônica de transmissão (MET).....	57
Resultados e Discussão.....	59
Microscopia de Varredura.....	59
Densidade e integridade dos vilos aos 7, 14 e 42 dias de idade.....	59
Avaliação da perda epitelial da mucosa intestinal aos 7, 14 e 42 dias de idade.....	66
Microscopia Eletrônica de transmissão do segmento de duodeno.....	72
Conclusão.....	77
Referências Bibliográficas.....	78
CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO.....	80
Resumo.....	81
Abstract.....	82
Introdução.....	83
Material e Métodos.....	85
Resultados e Discussão.....	87
Conclusão.....	91
Referências Bibliográficas.....	91
CAPÍTULO 5. AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE.....	94
Resumo.....	95

Abstract.....	96
Introdução.....	97
Material e Métodos.....	99
Resultados e Discussão.....	100
Conclusão.....	103
Referências Bibliográficas.....	104
CAPÍTULO 6. IMPLICAÇÕES.....	106
Implicações.....	107

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2. AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE O DESEMPENHO, BIOMETRIA E MORFOMETRIA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE**

	Página
Tabela 1. Composições centesimais e nutricionais calculadas das rações basais.....	28
Tabela 2. Ganho de peso médio (GP), peso final (PF), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), viabilidade (VB) e índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos de corte aos 7, 21, 35 e 42 dias de idade recebendo glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação na dieta.....	34
Tabela 3. Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos do trato gastrointestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade.....	37
Tabela 4. Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos do trato gastrointestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade....	38
Tabela 5. Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos do trato gastrointestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade....	39
Tabela 6. Espessura (μm) das diferentes camadas constituintes da parede do intestino delgado de frangos de corte aos 7 dias de idade suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação.....	41

Tabela 7. Espessura (μm) das diferentes camadas constituintes da parede do intestino delgado de frangos de corte aos 14 dias de idade suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação..... 43

Tabela 8. Espessura (μm) das diferentes camadas constituintes da parede do intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação..... 45

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA INTEGRIDADE INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO

Página

Tabela 1. Densidade de vilos (número de vilos/ mm^2) por segmento do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade..... 61

Tabela 2. Densidade de vilos (número de vilos/ mm^2) por segmento do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade..... 63

Tabela 3. Densidade de vilos (número de vilos/ mm^2) por segmento do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade..... 65

Tabela 4. Medida do eixo transversal dos enterócitos, altura e largura das microvilosidades do segmento de duodeno de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7, 14 e 42 dias de idade..... 74

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO

Página

Tabela 1. Médias do número de células PCNA positivas no ápice e cripta dos vilos da mucosa dos diferentes segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade.....	88
Tabela 2. Médias do número de células PCNA positivas no ápice e cripta dos vilos da mucosa dos diferentes segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade.....	90
Tabela 3. Médias do número de células PCNA positivas no ápice e cripta dos vilos da mucosa dos diferentes segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade.....	91

CAPÍTULO 5. AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE

Página

Tabela 1. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade.....	101
--	-----

- Tabela 2. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade..... 102
- Tabela 3. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade..... 103

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE O DESEMPENHO, BIOMETRIA E MORFOMETRIA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE

Página

- Figura 1. Fotomicrografia de segmentos do intestino delgado de frangos de corte aos 7 dias de idade. (M) Túnica mucosa, (CI) Túnica muscular circular interna, (LE) Túnica muscular longitudinal externa, T1: tratamento controle, T2: tratamento com suplementação de 1% de glutamina, T3: tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: segmento de duodeno; na linha 2: segmento de jejuno e na linha 3: segmento de íleo. Tricrômico de Masson, 20X..... 42
- Figura 2. Fotomicrografia de segmentos do intestino delgado de frangos de corte aos 14 dias de idade. (M) Túnica mucosa, (CI) Túnica muscular circular interna, (LE) Túnica muscular longitudinal externa, T1: tratamento controle, T2: tratamento com suplementação de 1% de glutamina, T3: tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: segmento de duodeno; na linha 2: segmento de jejuno e na linha 3: segmento de íleo. Tricrômico de Masson, 20X..... 44
- Figura 3. Fotomicrografia de segmentos do intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade. (M) Túnica mucosa, (CI) Túnica muscular circular interna, (LE) Túnica muscular longitudinal externa, T1: tratamento controle, T2: tratamento com suplementação de 1% de glutamina, T3:

tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: segmento de duodeno; na linha 2: segmento de jejuno e na linha 3: segmento de íleo. Tricrômico de Masson, 10X..... 46

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA INTEGRIDADE INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO

Página

- Figura 1. Fotomicrografia de escores de integridade da mucosa de acordo com a perda de epitélio do intestino delgado de frangos de corte. E1: sem perda de epitélio; E2: perda moderada, perda de epitélio desde o ápice do vilô até a metade do mesmo; E3: perda severa, com perda de epitélio na maior parte da extensão do vilô. Aumento de 200X..... 56
- Figura 2. Fotomicrografia de transmissão do duodeno de frangos de corte aos 7 dias de idade, H: altura da microvilosidade, ET: Eixo transversal dos complexos juncionais do enterócito. Aumento: 6800X. In set: L: Largura da microvilosidade, Aumento 11300X..... 59
- Figura 3. Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado de frangos de corte, aos 7 dias de idade. Em T1: Tratamento controle sem adição de aditivo; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico Na linha 1: Duodeno; na linha 2: Jejuno; e na linha 3: Íleo. Aumento 200X..... 61

- Figura 4. Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado de frangos de corte, aos 14 dias de idade. Em T1: Tratamento controle sem adição de aditivo; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: Duodeno; na linha 2: Jejuno; e na linha 3: Íleo. Aumento 200X..... 64
- Figura 5. Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado de frangos de corte, aos 42 dias de idade. Em T1: Tratamento controle sem adição de aditivo; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: Duodeno; na linha 2: Jejuno; e na linha 3: Íleo. Aumento 200X..... 65
- Figura 6. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 7 dias de idade..... 67
- Figura 7. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 7 dias de idade..... 67
- Figura 8. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do íleo de frangos de corte aos 7 dias de idade..... 68
- Figura 9. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 14 dias de idade..... 69
- Figura 10. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 14 dias de idade..... 69

- Figura 11. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do íleo de frangos de corte aos 14 dias de idade..... 70
- Figura 12. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 42 dias de idade..... 71
- Figura 13. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade..... 71
- Figura 14. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade..... 72
- Figura 15. Fotomicrografia da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 7 dias de idade. Em T1: Tratamento controle; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aumento 6800x..... 75
- Figura 16. Fotomicrografia da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 14 dias de idade. Em T1: Tratamento controle; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aumento 6800X..... 76
- Figura 17. Fotomicrografia da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 42 dias de idade. Em T1: Tratamento controle; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aumento 6800X..... 77

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO

Página

- Figura 1. Fotomicrografia do índice mitótico da mucosa duodenal de frangos de corte aos 7 dias de idade, no qual A) Mucosa duodenal (10X), V: Vilosidade, CR: Cripta. B) Ápice da vilosidade, seta: núcleo do enterócito marcada em marrom PCNA- positiva (20X), C: Cripta da mucosa do segmento duodenal (20X)..... 87

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO GERAL

O setor avícola vem crescendo muito nas últimas décadas, principalmente em função do desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias, permitindo grande destaque deste setor no mercado competitivo. Este destaque se deve a diversas áreas como: manejo, genética, sanidade, ambiência, bem-estar e nutrição. A inter-relação destes fatores permite a busca por índices zootécnicos cada vez mais altos, conduzindo a um elevado desempenho e crescimento animal.

O bom desempenho das aves depende da obtenção adequada de energia e compostos químicos pelo organismo. Para que isso ocorra é necessário que o trato gastrointestinal apresente características estruturais funcionais desde a ingestão dos alimentos até sua absorção (ROMER & PARSONS, 1981). Assim o aproveitamento do conteúdo nutricional, através da manipulação dos nutrientes na dieta, está diretamente relacionado com a estrutura e integridade do epitélio intestinal, tendo em vista que parte do processo digestivo, bem como a absorção dos nutrientes, ocorrem nos enterócitos (VIEIRA et al., 2006).

O trato gastrointestinal, quando mantido em equilíbrio e íntegro consegue de forma mais eficiente absorver nutrientes e impedir a fixação e multiplicação de agentes patogênicos na mucosa intestinal, prevenindo desta forma a instalação de doenças entéricas e, conseqüentemente, assegurando boa produtividade da ave (EDENS, 2003). Nesse sentido, o uso de microingredientes adicionados às dietas, vem sendo pesquisado, como por exemplo, os aminoácidos que realizam a síntese de proteínas e compostos nitrogenados, bem como estimulam o desenvolvimento da mucosa intestinal, principalmente nas primeiras semanas de vida, visto a importância da integridade entérica para o desempenho final das aves.

A glutamina, aminoácido dieteticamente não-essencial, tem sido tema de diversos estudos por sua participação em funções metabólicas, como integridade tecidual, controle do equilíbrio ácido-básico e transporte e doação de nitrogênio. Ela é encontrada em grandes quantidades no plasma sanguíneo, considerada importante combustível oxidativo para o intestino e é o principal substrato energético de células de proliferação rápida como os enterócitos. O desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento

da altura dos vilos, correspondendo assim ao aumento de células epiteliais e, conseqüentemente, no acréscimo da capacidade digestiva e absorptiva (NEWSHOLME et al., 2003b).

O imediato produto do metabolismo de glutamina em maior quantidade nas células é o glutamato, o qual é produzido pela ação da glutaminase, uma enzima encontrada em concentrações elevadas e associadas com as mitocôndrias em células que utilizam prontamente a glutamina. O glutamato é o mais abundante aminoácido intracelular e a glutamina é o mais abundante extracelular *in vivo*. O glutamato não pode facilmente atravessar as membranas de células, porque tem carga negativa e pH 7,4; e os transportadores de aminoácidos capazes de transportar o glutamato na célula estão presentes em densidade baixa na membrana plasmática (NEWSHOLME et al., 2003a). Acredita-se que o ácido glutâmico, fonte de nitrogênio não específico e precursor da glutamina possa agir como fonte de energia na estrutura das vilosidades.

A alimentação constitui maior parte dos custos totais da produção, o que torna de extrema importância à melhoria na eficiência de utilização das dietas. Embora, a glutamina e o ácido glutâmico são aminoácidos de alto valor comercial e ainda não são utilizados em dietas para animais, a combinação de ambos os aminoácidos acredita-se ser atuante nas vilosidades intestinais e seus efeitos observados diretamente sobre os enterócitos que são células responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes.

Desta forma, o estudo do sistema digestório das aves submetidas a dietas com adição de aminoácidos sintéticos, ligado ao desenvolvimento intestinal proporciona visualizar as possíveis alterações da integridade intestinal e na renovação celular oferecendo o entendimento dos processos digestivos que proporcionarão avanços dentro do manejo e nutrição de acordo com suas necessidades, bem como a possibilidade de proteger ou estimular o trato gastrointestinal durante as fases críticas do seu desenvolvimento preservando a capacidade de desempenho da ave, a fim de obter melhora dos índices produtivos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Maturação e desenvolvimento do trato gastrointestinal das aves

A ingestão de alimentos, digestão e absorção de nutrientes são considerados fatores limitantes para o crescimento de frangos de corte, principalmente nas primeiras semanas de vida das aves, devido a capacidade funcional do trato digestivo está imatura. Após a eclosão, o trato gastrointestinal sofre algumas alterações, como a maturação funcional do intestino, envolvendo mudanças morfológicas e fisiológicas, responsáveis pelo aumento na área de superfície de digestão e de absorção (MAIORKA et al., 2002). De acordo com Nir (1997), é necessário um período variável de maturação antes que o tamanho relativo do intestino e a produção enzimática do pâncreas otimizem a taxa de crescimento.

O intestino delgado é a porção mais longa do sistema digestório, responsável pela digestão final do alimento e absorção dos nutrientes (BOLELI et al., 2002). A quebra dos alimentos se faz no lúmen do intestino sob a influência de enzimas digestivas, ocorrendo parte da digestão na superfície das vilosidades, que são formadas pelos enterócitos e pela ação das enzimas de membrana. A máxima capacidade de digestão e absorção ocorre quando o animal apresenta grande área luminal, com altas vilosidades e enterócitos maduros, sendo fundamental para seu desenvolvimento (CERA et al., 1988), tornando os processos de absorção totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal.

O desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento da altura ou densidade dos vilos intestinais, o que corresponde ao maior número de suas células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas) e, portanto, aumento na capacidade digestiva e absorptiva do intestino. Sabe-se que o desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de dois eventos citológicos primários associados: renovação celular - proliferação e diferenciação, resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes localizadas na cripta e ao longo dos vilos (UNI et al., 1998; UNI et al., 2000) e perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos (síntese-migração-extrusão) é determinado por uma taxa de renovação constante que determina a manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, a manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal.

O epitélio intestinal apresenta crescimento contínuo e possui mecanismos de perda e renovação celular denominado *turnover*. Quando o intestino responde a algum agente

com um desequilíbrio neste *turnover*, ocorre modificação na altura dos vilos. Devido a isso, quando ocorre aumento na taxa de proliferação (mitose) com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, haverá aumento no número de células e, conseqüentemente, aumento na altura dos vilos. Quando o estímulo levar ao aumento na taxa de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, o intestino deverá responder com redução na altura dos vilos e, conseqüentemente, diminuição em sua taxa de digestão e absorção. De forma que, a redução na altura dos vilos ocorre por redução na taxa de proliferação ou aumento na taxa de extrusão (MAIORKA et al., 2002).

Estudos relacionados com o desenvolvimento da área e altura das vilosidades da mucosa intestinal demonstraram haver diferenças entre os segmentos intestinais. A maior velocidade de crescimento relativo da área e altura das vilosidades intestinais atinge o platô com 6 a 8 dias no segmento do duodeno e com 10 dias nos segmentos do jejuno e íleo (NOY; SKLAN, 1998).

2.2 - Histologia do intestino delgado de frangos de corte

As estruturas tubulares que compõem o sistema digestório das aves da região anterior para a posterior são: cavidade oral, esôfago, inglúvio, proventrículo, moela, intestino delgado, cecos e cólon-reto, sendo conectadas duas glândulas anexas, o fígado e o pâncreas (BOLELI et al., 2002). Assim, o intestino delgado é a porção mais longa do sistema digestório, responsável pela digestão final do alimento e absorção dos nutrientes, sendo dividido em três regiões: duodeno, jejuno e íleo.

O intestino delgado é constituído por quatro túnicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (TURK, 1982). A mucosa intestinal não apresenta as pregas macroscópicas observadas em mamíferos, mas possui muitas dobras microscópicas denominadas vilosidades ou vilos, que proporcionam aumento na superfície interna do órgão, ou seja, na área de digestão e absorção intestinal (BOLELI et al., 2002).

A túnica mucosa apresenta-se constituída por um epitélio estratificado pavimentoso, por uma lâmina própria, constituída de tecido conjuntivo frouxo e muscular da mucosa constituída de tecido muscular liso, a qual tem por função controlar os movimentos da mucosa intestinal que são independentes dos da túnica muscular. Em

certos órgãos, a túnica mucosa pode apresentar glândulas, designadas glândulas mucosas, por serem limitadas a essa camada (BOLELI et al., 2002; BOARO, 2009).

A túnica submucosa é constituída de tecido conjuntivo moderadamente denso, e tal como a mucosa pode conter glândulas submucosas. Em ambos os tipos de glândulas, os ductos se abrem na luz intestinal. Tanto na mucosa como na submucosa, o tecido conjuntivo é rico em vasos sanguíneos e linfáticos e pode conter nódulos linfóides (BOLELI et al., 2002).

A túnica muscular possui duas camadas de músculos lisos, a camada interna é formada de fibras musculares dispostas de forma circular ao trato digestório, sua contração alonga e constringe o intestino. A camada externa é constituída de fibras musculares dispostas longitudinalmente, que servem para encurtar o sistema digestório. A ação coordenada dessas duas camadas, da túnica muscular, promove a peristalse e a segmentação, a túnica serosa, por sua vez, é formada de tecido conjuntivo envolto por mesentério, com exceção da porção cervical do esôfago (BOLELI et al., 2002).

As projeções microscópicas denominadas de vilos são revestidas por epitélio simples, constituído por três tipos de celulares estrutural e funcionalmente distintas: enterócitos, células caliciformes e as células enteroendócrinas. Os enterócitos são células tipicamente colunares e seu núcleo encontram-se localizado na porção basal. Estas células respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte transepitelial dos nutrientes a partir do lúmen. Apresentam ainda um processo de maturação que ocorre durante o processo de migração da cripta (base) para o ápice do vilos. Esta maturação está na dependência da síntese de proteínas estruturais, as quais são codificadas pelo genoma das células intestinais. Já as células caliciformes são secretoras de glicoproteínas, que tem a função de proteger o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. Enquanto as células enteroendócrinas são produtoras de hormônios peptídicos (gastrina, secretina e colecistoquinina) e monoaminas biogênicas, substâncias essas que participam na regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes (MAIORKA, 2004).

Estes tipos celulares que compõem as vilosidades da mucosa do intestino delgado das aves respondem em parte pela defesa, digestão e absorção dos nutrientes, e pela regulação destes processos e pela proliferação e diferenciação destas células (BOLELI et al., 2002). Assim, para maximizar o desempenho das aves, é importante a

preservação da integridade morfofuncional do sistema digestório, por meio de técnicas de manejo adotadas, sanidade, além da adequada nutrição, que permitem o desenvolvimento do trato gastrointestinal, mantendo assim o funcionamento dos diferentes tipos celulares que compõem e caracterizam o sistema intestinal.

2.3 – Ação de agentes tróficos sobre a mucosa intestinal das aves

Agentes tróficos são aqueles que estimulam o desenvolvimento da mucosa intestinal, ou seja, estimulam o processo mitótico, e que estão relacionados com a ingestão e digestão dos alimentos, bem como, o tipo de nutrientes presentes no lúmen intestinal (MACARI, 1995).

Vários agentes parecem ter ação trófica sobre a mucosa intestinal, dentre eles encontram-se alguns aminoácidos (glutamina), ácidos graxos de cadeia curta, amins biogênicas, prebióticos (manoligossacarídeos e frutoligossacarídeos) e probióticos. Muitos destes agentes são indutores de mecanismos de transcrição gênica pela ativação de enzimas importantes no processo mitótico na região cripta-vilo. Por exemplo, a indução da enzima ODC (ornitina-descarboxilase), que é uma enzima importante no processo de proliferação celular, parece ocorrer quando na presença de glutamina. Outros têm ação indireta, ou seja, favorecem os mecanismos de manutenção da integridade epitelial pôr permitir maior sanidade na mucosa intestinal, através de processos que promovam o equilíbrio da microbiota intestinal (MAIORKA, 2004).

Desta forma, os efeitos tróficos dos nutrientes podem ser divididos em diretos e indiretos. Os efeitos diretos estão relacionados com a descamação, nutrição local e estimulação do crescimento por nutrientes específicos, independentemente de seu valor nutritivo. Nesse sentido, o processo mitótico parece ser regulado por substâncias que são liberadas no local tendo, portanto, ação parácrina ou autócrina, regulado por substâncias que são liberadas localmente (MAIORKA et al., 2002). É interessante salientar que Grant et al. (1953) já tinham demonstrado que, após a ingestão de ração, ocorria grande perda na mucosa e, conseqüentemente, renovação celular. Em seu estudo, Philpott (1971) mostrou que o extrato de mucosa do proventrículo de pintos era capaz de inibir a proliferação celular, evidenciando a presença de substâncias inibitórias nesse extrato. Esse mecanismo de inibição e estimulação da proliferação celular parece ser de fundamental importância no processo de reparo da mucosa, em especial em

processos lesivos. Os efeitos indiretos são mediados por hormônios e peptídeos encontrados nas células enteroendócrinas do epitélio intestinal, e apresentam ação regulatória sobre o desenvolvimento da mucosa. Dentre estes peptídeos incluem-se os fatores de transformação do crescimento, sendo eles: TGF- α , TGF- β , IGF (insulin like growth factor). Vários trabalhos tem mostrado que as células epiteliais produzem estes peptídeos e respondem a eles, apresentando efeitos diferentes na proliferação celular. O TGF- α é um estimulador da proliferação celular e o TGF- β , um potente inibidor da proliferação de células intestinais indiferenciadas (MAIORKA et al., 2002).

A ingestão de alimento é o fator estimulante do crescimento dos vilos e das criptas (MORAN Jr, 1985; FISCHER DA SILVA, 2001; LUQUETTI, 2005). Utilizando-se de caulin para avaliar o efeito do estímulo físico do alimento sobre o desenvolvimento da mucosa, Tarachai e Yamauchi (2000) verificaram que a mucosa intestinal parece não responder unicamente ao estímulo físico. Ao mesmo tempo, esses autores também observaram que, na presença de nutrientes no lúmen intestinal, ocorre maior desenvolvimento, traduzido na altura dos vilos e número de células em mitose e extrusão, sugerindo que o estímulo primário para o desenvolvimento da mucosa são os componentes químicos (nutrientes) da dieta.

2.4 - Metabolismo da Glutamina e Ácido Glutâmico no intestino

A glutamina é um aminoácido de grande importância nos processos metabólicos, além de ser considerado o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, sendo também encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros diversos tecidos corporais (ROWBOTTOM et al., 1996).

Glutamina e ácido glutâmico (glutamato) são aminoácidos considerados não essenciais devido à capacidade de síntese pelo organismo (LACEY & WILMORE, 1990). Porém, em algumas situações críticas como traumas, exercícios físicos exaustivos, estresse por calor, lesão na mucosa, as necessidades de um aminoácido não essencial podem ultrapassar a capacidade de síntese do organismo e, por ser fisiologicamente indispensável para o organismo, é denominado “condicionalmente essencial” (YOUNG & MARCHINI, 1990).

O glutamato é o mais abundante aminoácido intracelular (NEWSHOLME et al., 2003a), enquanto que a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no fluido

extracelular (aproximadamente 25% do total dos aminoácidos) e no *pool* de aminoácidos livres no corpo (mais de 60% do total de aminoácidos livres no músculo esquelético) (PIVA et al., 2001). É considerado quantitativamente o aminoácido de maior importância como combustível para células e tecidos que se dividem rapidamente, especialmente células do sistema imune e enterócitos (PIVA et al., 2001; NEWSHOLME et al., 2003a,b).

O metabolismo intracelular da glutamina é regulado através de duas enzimas principais: a enzima glutamina-sintetase, que catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia e a enzima glutaminase, que catalisa a hidrólise da glutamina e leva à formação de glutamato e amônia (MEISTER, 1980). O glutamato pode ser produzido a partir da transaminação do α -cetoglutarato (oxoglutarato) e pode ser utilizado na síntese protéica ou ser convertido em α -cetoglutarato e, nas células do intestino, à alanina (NEWSHOLME et al., 2003a,b). O fígado utiliza a alanina produzida pela degradação da glutamina no intestino para a gliconeogênese (HAUSSINGER, 1990). A energia gerada pela oxidação do α -cetoglutarato no ciclo de Krebs leva à produção de 30 moles de ATP, o que torna a glutamina e o glutamato substratos energéticos tão importantes quanto à glicose (MINAMI et al., 1992). O outro produto, a alanina, é um aminoácido que desempenha importante papel na gliconeogênese (HALL et al., 1996).

Além de participar na estrutura de proteínas e peptídeos, a glutamina é precursora da gliconeogênese, da aminogênese renal e de neurotransmissores como o ácido α -aminobutírico e o glutamato. Além disso, é doadora de nitrogênio para síntese de purinas e pirimidinas, que são elementos básicos dos nucleotídeos, sendo essenciais para o reparo da mucosa intestinal (STRYER, 1992). Está envolvida na neurotransmissão, diferenciação celular, manutenção do pH e também é considerada como principal substrato energético de células de proliferação rápida, como por exemplo enterócitos e linfócitos ativos (CYNOBER, 1999), além de aumentar a resposta imunológica frente a adversidades (TAUDOU et al., 1983) e aliviar a toxemia, ou seja, presença de toxinas de bactérias no sangue (O'DWYER et al., 1987).

A glutamina fornece cadeia de carbono e um grupo amínico que entra nas vias que levam à síntese de outros aminoácidos, nomeadamente prolina, ornitina e arginina. O nitrogênio amínico da glutamina pode ser utilizado para síntese de purinas e pirimidinas, constituintes básicos dos nucleotídeos (WU, 1998). Segundo Newsholme

(2001), o fato do nitrogênio amínico da glutamina ser utilizado para síntese de nucleotídeos, seria uma das explicações para a alta necessidade de glutamina em células que se proliferam rapidamente, como as do sistema imune e da mucosa intestinal.

A glutamina e o glutamato da dieta são absorvidos pelas células epiteliais a partir da luz intestinal para os capilares, através da membrana baso-lateral. O transporte através da membrana ocorre, principalmente, por meio de um sistema sódio dependente (BULUS et al., 1989). As células epiteliais da mucosa intestinal têm alta concentração de glutaminase, compatível com as altas taxas de captação e utilização de glutamina (PINKUS & WINDMUELLER, 1990).

A glutamina é absorvida juntamente com o sódio co-transportador que gera gradiente de concentração entre o meio intracelular e extracelular propiciando um fluxo de água para dentro das células e dilatando-as. Essa dilatação por hidratação, segundo Noé et al. (1996), resulta na ativação de proteínas sinalizadoras intracelulares (MAPK) que ativam proteínas quinases. Outros autores (BLIKSLAGER E ROBERTS, 1997 e RHOADS et al., 1997) também relataram que glutamina tem papel regulatório no organismo por ativar proteína quinase, que por sua vez, ativa transcrição gênica, e que a inibição da síntese de glutamina inibe tanto a proliferação, quanto a diferenciação de culturas de células da mucosa intestinal. A ativação do sistema MAPK e, conseqüentemente, das proteínas quinases pode explicar, em parte, as propriedades anabólicas da glutamina no fígado, músculo esquelético, mucosa intestinal ou sistema imune (HAUSSINGER et al., 2001).

São apresentados relatos de que o ácido glutâmico, fonte de nitrogênio não protéico, precursor da glutamina, possa agir também como fonte de energia na estrutura das vilosidades, ou seja, que ambos tenham uma via comum no enterócito, além das funções primordiais para manutenção da estrutura funcional. O glutamato é o centro da carga proteica diária e exerce papel chave na transaminação e desaminação de aminoácidos, o que inclui a formação de aspartato, alanina e glutamina (SAKAMOTO, 2009).

Doador de carbono e nitrogênio, em uma série de importantes vias metabólicas que incluem a síntese de prolina, citrulina e arginina, o glutamato entérico, e não o glutamato derivado da glutamina é fonte preferencial para síntese de glutatona na

mucosa (REEDS et al., 1997). A glutatona tem papel importante na proteção da mucosa contra danos peroxidativos e contra toxinas alimentares (AW & WILLIAMS, 1992).

O glutamato é considerado também um neurotransmissor excitatório que possui receptores no sistema nervoso central (OZAWA et al., 1998). Segundo Meldrum e Garthwaite (1990) a ativação excessiva destes receptores pelo glutamato pode acarretar em neurotoxicidade com degeneração neuronal e morte celular.

No pâncreas, o glutamato é importante substrato para a enzima ácido glutâmico descarboxilase, que produz a molécula sinalizadora α -amino ácido butírico GABA (RUBI et al., 2001), importante para regulação da secreção de insulina (WINNOCK et al., 2002).

Para Newsholme et al. (2003a,b) a glutamina em si pode funcionar como um precursor-chave para síntese de ácidos nucléicos e nucleotídeos, mas em muitas circunstâncias fisiológicas é o ato de fornecer o glutamato (via glutaminase), que parece promover ampla gama de funções metabólicas no organismo.

2.5 - Interação Glutamina, Ácido glutâmico e Mucosa Intestinal

A adição de aminoácidos na alimentação vem sendo intensamente estudada e a glutamina tem despertado interesse devido à ação trófica que exerce sobre a mucosa (WU et al., 1996; MAIORKA et al., 2000a), bem como os possíveis papéis metabólicos que o ácido glutâmico possa vir a substituir a glutamina no organismo.

A suplementação da glutamina tem sido estudada devido não ser bem conhecido o mecanismo pelo qual este aminoácido estimula a proliferação de células intestinais, assim segundo Rhoads et al. (1997) que trabalhando com células do jejuno de suínos observaram que a glutamina está envolvida na proliferação celular na mucosa intestinal aumentando a troca de sódio por hidrogênio na membrana plasmática e a atividade específica da enzima ornitina descarboxilase, corroborando os dados apresentados por Fischer da Silva (2001), que observaram maior atividade da enzima ornitina descarboxilase em frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com 1% de glutamina.

Em estudos com frangos de corte, Maiorka et al. (2000a) observaram que a suplementação de 1% de L-glutamina na dieta aumentou os parâmetros morfométricos da mucosa intestinal na primeira semana de vida, mas não melhorou as variáveis de

desempenho dos frangos, na segunda semana não houve aumento da morfometria da mucosa entérica, exceto para a profundidade da cripta e não foi também observado melhora no desempenho dos animais. MURAKAMI et al. (2007) trabalhando com glutamina e vitamina E na primeira semana de idade, observaram melhor desenvolvimento da mucosa intestinal em frangos que receberam 1% de L-glutamina, embora não observaram melhora no desempenho dos mesmos.

Em seu estudo, MORAN & STILLBORN (1994) relataram que a suplementação de glutamato melhorou o peso corporal final, mas não teve efeito sobre a eficiência alimentar. Enquanto Leclerq et al. (1994), observaram que a adição de glutamato e aspartato em dietas de baixa proteína e suplementadas com aminoácidos, aumentou a taxa de crescimento de frangos machos dos 30 aos 44 dias de idade e não teve efeito sobre a eficiência alimentar.

O efeito da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal sugere que este aminoácido pode ter papel importante na maturação da mucosa intestinal dos pintos nas duas primeiras semanas de idade (MAIORKA et al., 2000a).

Em estudo com frangos de corte, em comparação a dieta de milho e soja, o fornecimento de uma dieta com 1% de glutamina tendeu a diminuir a profundidade da cripta no duodeno e no jejuno aos 3 dias de idade após a eclosão e a melhorar a proporção vilosidade: cripta no jejuno aos 14 dias após a eclosão (YI et al., 2001a). Enquanto que em pesquisa realizada com perus, fornecendo 1% de glutamina na dieta, foi observado aumento na taxa de crescimento na primeira semana e a eficiência alimentar durante as três primeiras semanas após eclosão, embora não foram obtidos efeitos benéficos sobre a altura das vilosidades ou proporção vilosidade: cripta no duodeno e no jejuno em comparação a dieta controle de milho e soja (YI et al., 2001b).

Para Sakamoto et al. (2010), a suplementação das dietas com glutamina isolada ou associada com ácido glutâmico pode beneficiar a maturação da mucosa intestinal.

Acredita-se que o ácido glutâmico e a glutamina possuem uma via metabólica comum no enterócito, pois a glutamina é metabolizada em glutamato mais amônia pela glutaminase e o glutamato que apresenta papel chave na transaminação e desaminação de aminoácidos, o que inclui a formação do aspartato, alanina e glutamina. Dessa forma, o glutamato ou ácido glutâmico pode substituir a glutamina em diversos papéis metabólicos como geração de energia e síntese de aminoácidos (WU et al., 1995).

Já Reeds et al. (1996) relataram que 95% do glutamato da dieta de leitões presente na mucosa foi metabolizado na primeira passagem, e destes, 50% foram metabolizados em CO₂. Já a oxidação da glicose na primeira passagem pela mucosa foi muito limitada. Os autores concluíram que o glutamato é o maior contribuinte para a geração de energia no intestino.

Em experimento realizado com leitões desmamados aos 28 dias de idade, e fornecendo dietas com 1% de glutamina ou 1% de ácido glutâmico em comparação à dieta controle, Liu et al. (2002) verificaram que as dietas suplementadas com os aminoácidos, preveniram a atrofia do jejuno na primeira semana pós-desmame e melhoraram a capacidade de absorção de D-xilose pelo intestino delgado aos 7 e 14 dias após o desmame. Em comparação com os leitões alimentados com a dieta controle ou com 1% de glutamina, o fornecimento de 1% ácido glutâmico resultou em maior altura das vilosidades no jejuno 14 dias após o desmame e maior concentração de RNA no músculo esquelético 7 dias após o desmame.

Assim, estudos têm sido feitos para avaliar a utilização dos aminoácidos na forma pura, ou mesmo a associação entre os dois. Sakamoto (2009) trabalhando com 1,5% de glutamina e 3% da associação da glutamina com o ácido glutâmico observou melhores resultados de desempenho aos 14 dias de idade dos frangos de corte. Enquanto que Pelícia et al. (2011) em experimento desenvolvido com frangos de corte, utilizando 1% da associação de glutamina e o ácido glutâmico aos 7 e 21 dias de idade não encontraram efeito sobre o desempenho das aves. Ao incluir diferentes níveis de glutamina pura ou associada ao ácido glutâmico para frangos de corte, Alves et al. (2008) observaram melhora no desempenho com a suplementação, recomendando utilizar níveis de 1,5% de L-Gln e 3,0% da combinação de glutamina e ácido glutâmico.

Como nas primeiras semanas de vida dos frangos, a capacidade funcional do trato gastrointestinal é limitante para o consumo de alimento, digestão e absorção intestinal, grande atenção tem sido dada a adição de aminoácidos nestas dietas, na tentativa de reduzir a atrofia da mucosa intestinal, principalmente em situações de estresse. Mais estudos devem ser realizados com o intuito de entender o real mecanismo de atuação da glutamina sobre a proliferação da mucosa entérica, seja ela associada ou não ao ácido glutâmico, além da forma de atuação do ácido glutâmico no organismo

animal, uma vez que apresentam vias metabólicas que são muito parecidas na mucosa do intestino delgado.

Diante do exposto o Capítulo 2, denominado “**AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE O DESEMPENHO, BIOMETRIA E MORFOMETRIA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *British Poultry Science*, tendo como objetivo avaliar a biometria e a integridade da mucosa entérica de frangos de corte utilizando a microscopia óptica, e o desempenho em diferentes fases de criação, suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e a combinação de glutamina e ácido glutâmico na dieta.

O Capítulo 3, denominado “**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA INTEGRIDADE INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *Journal of Animal Science*, tendo como objetivo avaliar a integridade intestinal de frangos de corte através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão nas diferentes fases de criação, com dietas suplementadas com glutamina e ácido glutâmico isolados e a combinação de glutamina e ácido glutâmico.

O Capítulo 4, denominado “**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *Avian Pathology*, tendo como objetivo avaliar a proliferação celular através de marcadores mitóticos por meio de imunohistoquímica, utilizando a técnica de PCNA - Antígeno de Proliferação Celular nas diferentes fases de criação, suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e a combinação de glutamina e ácido glutâmico na dieta.

O Capítulo 5, denominado “**AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTAMICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE**”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na *British Poultry Science*, tendo como objetivo avaliar a atividade específica das enzimas intestinais maltase, sacarase e fosfatase alcalina na mucosa do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e a combinação de glutamina e ácido glutâmico na dieta.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, P. C. C. et al. Determinação do nível ótimo de inclusão de fontes de glutamina na fase inicial de frangos de corte: Desempenho de 1 a 42 dias. In: 16º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 2008. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/16Siicusp/2176.pdf>>. Acessado em: 12 out. 2012.
- AW, T.Y.; WILLIAMS, M. W. Intestinal absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids in rats: effect of exogenous GSH. **American Journal of Physiology**, v. 263, p. G665–G672, 1992.
- BLIKSLAGER, A.T.; ROBERTS, C. Mechanisms of intestinal mucosal repair. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, p. 1437-1441, 1997.
- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep; p. 75-96, 2002.
- BOARO, M. BOARO, M. Morfofisiologia do trato intestinal. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2009, Porto Alegre. **Anais... Facta**: Campinas, p. 262-274, 2009.
- BULUS, N. M.; ABUMRAD, N. N.; GHISHAN, F. K. Characteristics of glutamine transport in dog jejunal brush border membrane vesicles. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. 80-85, 1989.
- CERA, K.R.; MAHAN, D.C.; CROSS, R.F.; REINHART, G.A.; WHITMOYER, R.E. Effect of age, weaning and posweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 574-584, 1988.
- CYNOBER, L.A. Glutamine metabolism in stressed patients. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON AMINO ACIDS, Germany. **Proceedings...** Germany: p.5 (abstract), 1999.

- EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p.75-97, 2003.
- FISCHER DA SILVA, A.V. **Efeitos da restrição alimentar precoce e da glutamina no desempenho e na mucosa intestinal de frangos**. 2001.77f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- GRANT, R.; GROSSMAN, M.I.; IVY, A.C. Histological changes in gastric mucosa during digestion and their relationship to mucosal growth. **Gastroenterology**, v.25, p.218-231, 1953.
- HALL, J. C.; HEEL, K.; McCAULEY, R. Glutamine. **British Journal of Surgery**, v. 83, p. 305-312, 1996.
- HAUSSINGER, D.; GARF, D.; WEIERGRABER, O. H. Glutamine and cell signaling in liver. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2509S-2514S, 2001.
- HAUSSINGER, D. Nitrogen metabolism in liver: structural-functional organization and physiological relevance. **Biochemistry Journal**; v. 267, p. 289-290, 1990.
- LACEY, J. M.; WILMORE, D. W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Review**, v. 48, p. 297-309, 1990.
- LECLERCQ, B.; CHAGNEAU, A.M.; COCHARD, T.; KHOURY, J. Comparative responses of genetically lean and fat chickens to lysine, arginine, and non-essential amino acid supply. I growth and body composition. **British Poultry Science**, v.35, p. 687-696, 1994.
- LIU, T.; PENG, J.; XIONG, Y.; ZHOU, S.; CHENG, X. Effects of dietary glutamine and glutamate supplementation on small intestinal structure, active absorption and DNA, RNA concentration in skeletal muscle tissue of weaned piglets during d 28 to 42 of age. Asian-Aust. **Journal of Animal Science**, v. 15, n. 2, p. 238-242, 2002.
- LUQUETTI, B.C. **Efeito da vacinação contra coccidiose aviária e da suplementação de glutamina ou prebiótico sobre a mucosa intestinal em frangos**. 2005. 106f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- MACARI, M. Mecanismos de proliferação e reparação da mucosa gastrintestinal em aves. In: SIMPÓSIO DE COCCIDIOSE E ENTERITE, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: [s.n.], 1995.
- MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. **Anais...** V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó Santa Catarina, Brasil, 26–41. Abril 2004.

- MAIORKA, A., BOLELI, I.C., MACARI, M. Desenvolvimento e Reparo da Mucosa intestinal. In: MACARI, M., FURLAN, R.L., GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 113-123p, 2002.
- MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; SANTIN, E.; BORGES, A.S.; BOLELI I.C.; MACARI, M. Influência da suplementação de Glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p. 487-490, 2000 a.
- MAIORKA, A. Qualidade intestinal em frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, p. 141-148, 2000b.
- MEISTER, A. Catalytic mechanism of glutamine synthetase, overview of glutamine metabolism, glutamine: metabolism, enzymology and regulation. In: MORA, J. & PALACIOS, R., eds. New York: **Academic Press**, p.1-40, 1980.
- MELDRUM, B. S.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 11, p. 379-387, 1990.
- MINAMI, H.; MORSE, E. L.; ADIBI, S. A. Characteristics and mechanism of glutamine dipeptide absorption in human intestine. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 3-11, 1992.
- MORAN Jr, E.T.; STILLBORN, H.L. Responses of broilers to glutamic acid when given reduced CP feeds high and low in potassium. **Poultry Science**, v.73 Supl. 1: p. 74, 1994.
- MORAN Jr, E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and the events through perinatal development. **Journal of Nutrition**, v.115, p.665-674, 1985.
- MURAKAMI, A.E.; SAKAMOTO, M.I.; NATALI, M.R.M.; SOUZA, L.M.G. FRANCO, J.R.G. Supplementation of Glutamine and Vitamin E on the Morphometry of the Intestinal Mucosa in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 86, p. 488-495, 2007
- NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, T. Glutamine and glutamate - their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**, v. 21, p. 1-9, 2003a.
- NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, T. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 153-163, February, 2003b.

- NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v. 5, p. 2515S-2522S, 2001.
- NIR, I. Optimization of early growth in fast –growing broilers; Nutrition and physiological aspects. In: JORNADA INTERNACIONAL DE AVICULTURA DE CARNE. 1997, **Anais...** p.2-10
- NOÉ, B.; SCHLISS, F.; WETTSTEIN, M.; HEINRICH, S.; HAUSSINGER, D. Regulation of taurocholate excretion by a hypoosmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. **Gastroenterology**, v. 110, p. 858-865, 1996.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Metabolic Responses to Early Nutrition. **Journal Applied Poultry Research**, 7: 437-451, 1998.
- O'DWYER, S.T.; SCOTT, T.; SMITH, R.J. 5-Fluorouracil toxicity on small intestine mucosa but not while blood cells is decreased by glutamine. **Clinical Research**, v. 38, p. 10-16, 1987.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 581-618, 1998.
- PELICIA, V.C.; SARTORI, J.R.; ARAUJO, P.C.; STRADIOTTI, A.C.; POLYCARPO, G.V.; SOUZA, I.M.G.P.; VERCESE, F. Glutamina mais ácido glutâmico e aditivos fitogênicos na dieta inicial de frangos de corte alternativos criados sobre cama reutilizada. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnológica Avícolas, Santos – SP, FACTA, **Anais...** CDRom, 2011.
- PHILPOTT, G.W. Tissue specific inhibition of cell proliferation in embryonic stomach epithelium in vitro. **Gastroenterology**, v.61, p.24-43.1971.
- PINKUS, L.M.; WINDMUELLER, H.G. Phosphate-dependent glutaminase of small intestine and localization and role in intestinal glutamine metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.182, p. 506-517, 1990.
- PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERG, J. E. Glutamine in gut metabolism. **Gut environment of pigs**, 2001, 260p.
- REEDS, P. J.; BURRIN, D. G.; STOLL, B.; JAHOR, F.; HENRY, J.; FRAZER, M.E. Enteral glutamate is the preferential precursor for mucosal glutathione synthesis in the piglet. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. E408–E415, 1997.
- REEDS, P. J.; WYKES, L. J.; HENRY, J. E.; FRAZER, M. E.; BURRIN, D. G.; JAHOR, F. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. **Animal Journal Physiology**, v. 270, p. E413-E418, 1996.

- ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v.21, p.80-97, 1996.
- RHOADS, J.M.; ARGENZIO, R.A.; CHEN, W.; RIPPE, R.A.; WESTWICK, J.K.; COX, A.D.; BERSCHNEIDER, H.M.; BRENNER, D.A. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. **American Journal of Physiology** v. 272 (Gastrointestinal Liver Physiology. 35), p.G943-G953, 1997.
- ROMER, A.S. & PARSONS, T.S. Anatomia Comparada. México, **Interamericana**, 1981.
- RUBI, B. et al. GAD65-mediated glutamate decarboxylation reduces glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36391-36396, 2001.
- SAKAMOTO, M. I. et al. Influência da glutamina e nucleotídeos sobre a morfometria intestinal em frangos de corte vacinados contra a coccidiose. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2010, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2010. 1CD Rom.
- SAKAMOTO, M. I. **Desempenho, desenvolvimento e atividade enzimática da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com glutamina e nucleotídeos**. 2009. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2009.
- STRYER, L. **Bioquímica**. Trad. João Paulo de Campos. 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881p.
- TARACHAI, P.; YAMAUCHI, K. Effects of luminal nutrient absorption, intraluminal physical stimulation, and intravenous parenteral alimentation on the recovery responses of duodenal villus morphology following feed withdrawal in chickens. **Poultry Science**, v.79, p.1578-1585. 2000.
- TAUDOU, G.; WIART, J.; PIAIJEL, J. Influence of amino acid deficiency and tRNA aminoacylation on DNA synthesis and DNA polymerase activity during secondary immune response in vitro. **Molecular Immunology**, v. 20, p. 255, 1983.
- TURK, D.E. The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. **Poultry Science**, v.661, p.1225-1244, 1982.
- UNI, Z.; ZAIGER, G.; GAL-GARBER, O.; PINES, M.; ROZENBOM, I.; REIPEN, R. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. **British Poultry Science**, v.41, p.410-415. 2000.
- UNI, Z.; GANOT, S., SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v.77, p. 75-82, 1998.

- VIEIRA, B. S.; FARIA FILHO, D. E.; TORRES, K. A. A.; BORGES, D. M. B.; ROSA, P. S.; FURLAN, R. L. Administração *in ovo* de glutamina e de lisina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos na primeira semana pós-eclosão. **ARS Veterinária**, v. 22, n 3, p. 242-247, 2006.
- WINNOCK, F.; LINQ,Z.; DE PROFT, R.; DEJONQLHE,S.; SCHUIT, F.; GORUS, F.; PIPELEERS,D. Correlation between GABA release from rat islet β -cells and their metabolic state. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. E937-E942, 2002.
- WU, G.; MEIER, S. B.; KNABE, D. A. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2578-2584, 1996.
- WU, G.; KNABE, D.A.; YAN, W.; FLYNN, N.E. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **American Journal of Physiology**, v.268, p.R334-R342, 1995.
- WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249-1252, 1998.
- YI, G.F.; ALLEE, G.L.; FRANK, J.W.; SPENCER, J.D.; TOUCHETTE, K.J. Impact of glutamine, menhaden fish meal and spray-dried plasma on the growth and intestinal morphology of broilers. **Poultry Science**, v. 80, Suppl. 1 Abstract, 2001a.
- YI, G.F.; ALLEE, G.L.; LIU, H.J.; FRANK, J.W.; SPENCER, J.D. Apparent ileal digestibility of amino acids in soybean meal, menhaden fish meal, catfish meal and spray dried plasma in young broilers. **Poultry Science**, v. 80, Suppl. 1 Abstract, 2001b.
- 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. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 270-289, 1990.

CAPÍTULO 2:

**AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE O DESEMPENHO,
BIOMETRIA E MORFOMETRIA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE**

**AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE O DESEMPENHO,
BIOMETRIA E MORFOMETRIA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE**

RESUMO- Realizaram-se dois experimentos no Setor de Avicultura/ UNESP/Botucatu. No primeiro, com objetivo de avaliar o desempenho de frangos de corte, foram alojados 720 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®], com densidade populacional de 12 aves/m². O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições de 30 aves cada. No segundo, objetivou-se avaliar a biometria intestinal e a integridade da mucosa entérica por meio da microscopia óptica, sendo alojados 340 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®]. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições de 17 aves cada. Os tratamentos foram em ambos experimentos: 1- Ração basal; 2- Ração basal com suplementação de 1% de glutamina; 3- Ração basal com suplementação de 1% de ácido glutâmico; 4- Ração basal com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. No experimento I, foram avaliados o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade ao final de cada fase de criação e o IEP aos 42 dias de idade. Já no experimento II, foram sacrificadas 180 aves, sendo que em cada período avaliado aos 7, 14 e 42 dias de idade apenas 60 aves foram eutanasiadas por vez, sendo coletados para a avaliação da biometria entérica, os intestinos de 15 aves por tratamento, enquanto que para a morfometria das diferentes túnicas da parede intestinal, destas 60 aves sacrificadas por período, cinco aves por tratamento foram coletados os segmentos do intestino delgado, totalizando 20 aves por período avaliado. Aos 7, 21 e 35 dias de idade, as aves suplementadas com os aminoácidos sintéticos apresentaram melhores conversões alimentares, quando comparado ao grupo controle. A biometria entérica não foi influenciada pelos tratamentos. A morfometria das diferentes túnicas da parede intestinal foi influenciada aos 7 dias de idade, sendo que as aves suplementadas com 1% de ácido glutâmico apresentou maior espessura da túnica serosa no duodeno e da túnica mucosa no jejuno. Entretanto aos 14 e 42 dias de idade, os tratamentos não influenciaram a espessura das túnicas. No período total de criação, os aminoácidos sintéticos avaliados não melhoraram a biometria e a morfometria intestinal e o desempenho dos frangos de corte.

Palavras-chave: aminoácidos, aves, morfometria, mucosa intestinal.

**ACTION OF GLUTAMINE AND ACID GLUTAMIC ON PERFORMANCE,
BIOMETRIC AND MORPHOMETRY ENTERIC OF BROILERS**

ABSTRACT - Two experiments were conducted in the Poultry Section/UNESP/Botucatu. In the first, to evaluate the performance of broilers, 720 chicks of one day old, male, Cobb[®] were allocated, in a population density of 12 birds/m². The experimental design was completely randomized with four treatments and six replicates of 30 birds each. In the second, to evaluate intestinal biometrics and integrity of enteric mucosa through optical microscopy, that 340 chicks of one day old male, Cobb[®] were allocated. The design was completely randomized with four treatments and five replicates of 17 birds each. The treatments were both experiments: 1 - basal ration; 2 - basal ration supplemented with 1% glutamine; 3 - basal ration supplemented with 1% glutamic acid; 4 - basal ration supplemented with 2% of the combination of glutamine and glutamic acid. In experiment I, weight gain, feed intake, feed conversion and viability at end each phase of raising and the IEP at 42 days of age were evaluated. In experiment II, 180 birds were sacrificed, and at each period assessed at seven, fourteen and forty two days only 60 birds were euthanized being collected for the evaluation of enteral biometrics, the intestines of 15 birds per treatment, while for the morphometry of different tunics small intestine, these 60 birds sacrificed by period, five birds per treatment were the small intestine segments, totaling 20 birds per evaluation period listed. In for seven, fourteen and thirty-five days of birds supplemented with synthetic amino period showed better feed conversion when compared to the control group. The enteric biometric was not influenced the treatments. The morphometry of different coats of the intestinal wall was influenced at 7 days of age, and the birds supplemented with 1% glutamic acid was significantly more thicker tunica serosa of the duodenum and jejunum mucosa. However at fourteen and forty two days of age, the treatment did not affect the tunics thickness. Total period of raising, the synthetic amino acids evaluated did not improve the biometric and intestinal morphology and performance of broilers.

Keywords: amino acids, birds, morphometry, intestinal mucosa.

INTRODUÇÃO

Na eclosão, o trato digestório das aves está anatomicamente completo, embora sua capacidade funcional de digestão esteja imatura e com baixa capacidade de aproveitamento dos nutrientes fornecidos pela dieta. Assim, o processo de maturação da mucosa intestinal nas primeiras semanas de vida pode afetar de forma significativa o desempenho, já que a mucosa entérica tem a função de realizar a digestão e absorção de nutrientes, o que representa importante papel na fisiologia animal (MAIORKA et al., 2000).

A integridade das células da mucosa intestinal é de fundamental importância para o desempenho das aves, pois os processos de absorção dos alimentos ocorrem na membrana das células epiteliais que estão presentes nas vilosidades do intestino delgado (MAIORKA et al., 2002). Portanto para mantermos um máximo desenvolvimento da ave, a saúde intestinal tem despertado grande atenção, visto que a maioria dos processos de digestão ocorre na superfície das células da mucosa, pela ação das enzimas de membrana, o que torna fundamental manter a integridade entérica para melhor desempenho do animal.

Durante o desenvolvimento inicial da ave, o intestino delgado aumenta em peso mais rapidamente que a musculatura corporal. Este processo de rápido crescimento em relação ao peso corpóreo é verificado desde o terço final da incubação, alcançando máximo desenvolvimento do quarto ao oitavo dia de idade em frangos (NOY & SKLAN, 1998). Segundo Sell (1996), a capacidade de pintos de um dia de vida para ingerir e absorver nutrientes é bastante limitada, em função da imaturidade do trato gastrointestinal logo após a eclosão, pois a atividade das enzimas digestivas produzidas pelo pâncreas e pela mucosa intestinal é relativamente baixa neste período.

A estrutura dos órgãos tubulares do sistema digestório das aves segue, como nos demais mamíferos, um modelo estrutural básico, constituído por quatro túnicas, com características histológicas e funcionais distintas, denominadas da luz tubular para periferia do órgão de: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Entretanto, a mucosa intestinal possui muitas vilosidades, que proporcionam um aumento na superfície interna do órgão, ou seja, na área de digestão e absorção intestinal (BOLELI et al., 2002).

A mucosa do intestino tem crescimento contínuo e é afetada não apenas pelos hormônios metabólicos, mas também por outros fatores relacionados com o alimento como características físicas e químicas dos nutrientes e microbiota intestinal. Dessa forma, o desenvolvimento da mucosa depende tanto de fatores endógenos como exógenos (MAIORKA et al., 2000).

Alguns nutrientes adicionados às dietas estão diretamente relacionados com a integridade da mucosa, o que torna de fundamental importância estudar a influência destes sobre a fisiologia digestiva das aves. Nesse sentido, a suplementação de glutamina parece ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento da mucosa na primeira semana pós-eclosão (MAIORKA et al., 2000), uma vez que é considerada como principal substrato para os enterócitos. Outro aminoácido que vem sendo pesquisado é o ácido glutâmico, que do ponto de vista metabólico, ambos são intercambiáveis como importante substrato para o sistema celular da mucosa (REEDS & BURRIN, 2001).

Desta forma, o objetivo da condução do presente estudo foi avaliar a biometria e morfometria da mucosa entérica e o desempenho de frangos de corte suplementados

com glutamina e ácido glutâmico isolados e a combinação de glutamina e ácido glutâmico nas diferentes fases de criação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos no aviário experimental FMVZ/UNESP/Botucatu. No experimento I foram utilizados 720 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®] 500, com densidade populacional de 12 aves/m², por 42 dias para as análises de desempenho zootécnico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições de 30 aves em cada. Para o experimento II, foram utilizados 340 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®] 500, por 42 dias, sendo utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições de 17 aves em cada, para as análises de biometria e morfometria intestinal. Os tratamentos de ambos os experimentos foram: 1- Ração basal; 2- Ração basal com suplementação de 1% de glutamina; 3- Ração basal com suplementação de 1% de ácido glutâmico; 4- Ração basal com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico.

O experimento foi alojado em aviário experimental com 40m de comprimento por 8,0m de largura, pé direito de 3,50m e está dividido em 48 boxes. Cada boxe está equipado com um comedouro tubular e um bebedouro pendular. O aviário está dotado de ventiladores distribuídos de forma a promover ventilação homogênea em todos os boxes.

O sistema de manejo adotado foi o tradicionalmente utilizado nas criações comerciais de frangos de corte. Durante a primeira semana de idade foram utilizados bebedouros do tipo pendular e comedouros tubulares infantis. A partir da segunda

semana, foram utilizados bebedouros pendulares e comedouros tubulares. O aquecimento inicial foi feito com campânulas elétricas providas de lâmpadas infravermelhas 250 w. O fornecimento de luz durante o período experimental foi realizado de forma a completar 23 horas diárias de luz durante a primeira semana, 22hs de luz na segunda e terceira semana e 20hs de luz a partir da quarta semana de criação.

A cama utilizada foi de maravalha reaproveitada de um lote comercial de frangos de corte, que após ter passado por processo de fermentação sendo coberta com lona plástica em toda sua extensão foi distribuída no aviário. Os dados de temperatura e umidade máxima e mínima foram registrados diariamente utilizando-se um termo-higrômetro de máxima e mínima, sendo a média da temperatura 30,9°C e 21,3°C, e da umidade relativa de 85,60% e 43,86%, respectivamente. O arraçoamento foi dividido em quatro fases: pré - inicial (1-7 dias), inicial (8-21 dias), crescimento (22-35 dias) e final (36-42 dias), sendo que as rações foram formuladas com base nos valores de composição e exigências nutricionais proposto por Rostagno et al. (2011). As aves receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os tratamentos foram estabelecidos a partir da substituição do amido de milho nas rações por apresentarem valores energéticos semelhantes aos aminoácidos e ao produto comercial, sendo que no primeiro tratamento foi adicionado o amido de milho (2% de amido de milho), no segundo foi adicionado 1% de glutamina e 1% de amido de milho, no terceiro tratamento foi adicionado 1% de ácido glutâmico e 1% de amido de milho e no quarto tratamento foi adicionado 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico (produto comercial AminoGut[®] que apresenta garantia mínima de 10% de glutamina e 10% de ácido glutâmico). Foram utilizadas rações isoprotéicas, isocalóricas e isoaminoacídicas elaboradas a base de milho e farelo de soja (Tabela 1).

Tabela 1. Composições centesimais e nutricionais calculadas das rações basais.

Ingredientes	Pré-inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)	Crescimento (22 a 35 dias)	Final (36 a 42 dias)
Milho Moído	52,681	56,845	59,475	64,253
Farelo de soja (45%)	38,740	35,221	32,013	27,790
Óleo de soja	2,210	2,163	3,145	2,950
Fosfato bicálcico	1,910	1,512	1,293	1,100
Calcário calcítico	0,911	0,921	0,850	0,750
DL-metionina	0,358	0,288	0,257	0,242
L-lisina HCl	0,272	0,205	0,180	0,220
Treonina	0,108	0,060	0,040	0,050
Bicarbonato de Sódio	0,125	0,125	0,125	0,125
Cloreto de colina	0,060	0,060	0,050	0,040
Sal comum	0,425	0,400	0,372	0,380
Anticoccidiano ¹	0,050	0,050	0,050	-
Suplemento Vit ²	0,100	0,100	0,100	0,050
Suplemento mineral ³	0,050	0,050	0,050	0,050
Amido de milho	2,000	2,000	2,000	2,000
Total	100,000	100,000	100,000	100,000
Composição Nutricional Calculada				
EM (kcal/kg)	2950	3000	3100	3150
Proteína (%)	22,20	20,80	19,50	18,00
Cálcio (%)	0,920	0,819	0,732	0,638
P Disp (%)	0,470	0,391	0,342	0,298
Lis Digestível (%)	1,310	1,174	1,078	1,010
Met Digestível (%)	0,511	0,458	0,431	0,404
Met + Cist Digest (%)	0,944	0,846	0,787	0,737
Treonina (%)	0,852	0,763	0,701	0,656
Potássio (%)	0,590	0,585	0,580	0,580
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200	0,195
Cloro (%)	0,200	0,190	0,180	0,170

¹ Salinomicina; ²Suplemento Vitamínico: MC-MIX Frangos Inicial 1 kg (Mcassab®) níveis de garantia/kg de ração para as fases pré-inicial e inicial: Vit. A 11.000 UI; Vit. D3 2.000 UI ; Vit. E 16 UI ; Vit. K 1,5 mg; Vit B1 1,2 mg; Vit B2 4,5 mg; Vit B6 2mg; Vit. B12 16 µg; Ácido fólico, 0,4 mg; Ácido Pantotênico 9,2 mg; Biotina, 0,06 mg; Niacina, 35 mg; Se, 0,25 mg; MC-MIX Frangos Engorda 1 kg (Mcassab®) níveis de garantia/kg de ração fase de crescimento: Vit. A 9.000 UI; Vit. D3, 1.600 UI; Vit. E, 14UI; Vit. K 1,5 mg; Vit B1 1,0 mg; Vit B2 4,0 mg; Vit B6 1,8mg; Vit. B12, 12 µg; Ácido fólico, 0,3 mg; Ácido Pantotênico 8,28 mg; Biotina, 0,05 mg; Niacina, 30 mg; Se, 0,25 mg; MC-MIX Frangos Abate 0,5 kg (Mcassab®) níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 3.000 UI; Vit. D3 500 UI ; Vit. E, 5 UI ; Vit. K 0,5 mg; Vit B1 0,3 mg; Vit B2 1 mg; Vit B6 0,4mg; Vit. B12 3 µg; Niacina 5mg; Ácido Pantotênico 3,68 mg; Biotina, 15 mg; Se, 0,2 mg; ³Suplemento Mineral: MC-MIX Mineral Aves 0,5 kg (Mcassab®) níveis de garantia/kg de ração : Ferro 30 mg; Cobre 9 mg ; Manganês 60 mg; Zinco 60 mg ; I, 1 mg. EM= Energia Metabolizável, P disp = Fósforo disponível; Lis = lisina; Met + Cist digest = metionina + cistina digestível;

Desempenho das aves

No experimento I foi avaliado o desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade) em que foram registradas as quantidades de ração consumida e realizadas as pesagens das aves no início e no final de cada fase. As mortalidades foram registradas diariamente para determinação do consumo real de ração. O consumo de ração foi calculado pela diferença de pesos entre a quantidade fornecida e as sobras existentes no final de cada fase, dividido pelo número de aves existentes em cada tratamento. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre a pesagem inicial e final de cada fase, dividido pelo número de aves de cada tratamento. A conversão alimentar foi obtida pela relação entre o consumo de ração das aves e seu ganho de peso em cada fase e corrigido pelo peso das aves mortas no período. A mortalidade foi calculada pela relação entre o número de aves que morrerem em cada fase e o número inicial, multiplicado por 100. A viabilidade e o índice de eficiência produtiva (IEP) também foram calculados. A fórmula utilizada para o cálculo do IEP foi: $\text{ganho de peso diário (g)} \times \text{viabilidade (\%)} / \text{conversão alimentar} \times 10$ (MENDES & PATRÍCIO 2004).

No experimento II, para a coleta dos dados de biometria entérica, foram sacrificadas um total de 180 aves, sendo que realizou-se abates nos períodos de 7, 14 e 42 dias de idade, em que foram sacrificadas por período 60 aves, que foram transportadas para o abatedouro experimental da FMVZ/UNESP/Botucatu e após jejum de 6 horas, foram pesadas individualmente, insensibilizadas por eletronarcole e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. Para a morfometria intestinal, destas 60 aves avaliadas por período na biometria entérica, 20 aves por período (aos 7,

14 e 42 dias) foram coletadas os segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e acondicionadas em potes com fixador de formalina tamponada 10%.

Biometria Entérica

Em cada período aos 7, 14 e 42 dias foram eutanasiadas 15 aves por tratamento, totalizando 60 aves por período avaliado, das quais foi retirado o trato gastrointestinal e em seguida, efetuadas pesagens do intestino completo e posteriormente de seus segmentos (duodeno, jejuno e íleo, cecos e cólon), em balanças semi-analíticas. A avaliação do comprimento dos segmentos intestinais foi realizada com o auxílio de uma fita métrica.

Morfometria Intestinal

Para a análise histológica da mucosa intestinal, foram coletados segmentos de aproximadamente 2 cm do duodeno (a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal), jejuno (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel) e íleo (entre o divertículo de Meckel e o início dos cecos) de uma ave por repetição, sendo cinco aves por tratamento nos diferentes períodos analisados (7, 14 e 42 dias de idade), totalizando 20 aves por período avaliado. As amostras coletadas foram abertas pela sua borda mesentérica e lavados com água destilada, posteriormente fixados em placas de polipropileno e mergulhados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após esse período, o material foi reduzido a fim de eliminar as bordas dilaceradas e foram lavados em água corrente por 48 horas, com a finalidade de retirar o fixador utilizado.

Após fixação e secção, todo material foi desidratado por imersão em uma série crescente de alcoóis (entre 70% e absoluto), diafanizado em três trocas de xilol e

incluído em parafina plástica. Para a inclusão os segmentos foram orientados para obtenção de cortes histológicos longitudinais, em relação ao maior eixo do intestino.

A microtomia foi realizada com auxílio de micrótomo automático (*Leica, RM-2145*) equipado com navalhas descartáveis, obtendo-se uma série de cortes com 4-5 μm de espessura. Os cortes foram colocados em álcool 30%, em seguida imersos em água destilada a 37°C e, posteriormente, distendidos sobre lâminas histológicas e levados para estufa, onde permaneceram por no mínimo 60 minutos a uma temperatura de 60°C. Após esses procedimentos os cortes sofreram a desparafinização, através de duas passagens pelo xilol. Posteriormente, foram hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e submetidos aos métodos de colorações histológicas (CAPUTO et al., 2010).

Os cortes histológicos foram corados por Tricrômico de Masson, de acordo com a metodologia preconizada por Behmer et al. (2003). Em seguida, a morfometria das diferentes túnicas do intestino, sendo elas: mucosa, túnica muscular, constituída por camada circular interna e camada longitudinal externa e a túnica serosa foi obtida através das análises dos cortes histológicos realizadas com auxílio do microscópio óptico acoplado a um sistema computadorizado de captura de imagem (*Leica Qwin 3.0*). Foram realizadas 30 medidas por túnica de cada lâmina estudada.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional Statistical Analysis System (2009), utilizando o procedimento *General Linear Models* (GLM). As médias entre os tratamentos, quando significativas, foram comparadas pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho

Para o período de 1 a 7 dias de idade, observou-se que o ganho de peso, peso final e consumo de ração não foram influenciados pelos tratamentos ($p>0,05$). Enquanto que a conversão alimentar apresentou diferença ($p<0,05$); sendo melhor para as aves que foram suplementadas com os aminoácidos sintéticos na ração quando comparado com o controle (Tabela 2). Neste período, a viabilidade foi 100%. Resultados diferentes foram encontrados por Maiorka et al. (2000), que trabalhando com 1,0% glutamina na ração para frangos de corte, não encontraram diferenças para as variáveis de desempenho durante a fase pré-inicial.

Em seu estudo, Sakamoto (2009) ao suplementar dietas para frangos de corte, com diferentes níveis de glutamina (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e a combinação de glutamina e ácido glutâmico (0,5; 1,5; 3,0 e 5,0%), encontrou resultados semelhantes com os do presente estudo, quando suplementou aminoácidos sintéticos na ração e obteve um melhor valor para a conversão alimentar das aves.

Nos primeiros dias de vida das aves, o trato gastrointestinal está imaturo apresentando capacidade limitada para digerir e absorver os nutrientes da ração. Assim, substâncias que tenham ação trófica sobre a mucosa intestinal, aumentando sua capacidade funcional, poderão propiciar melhor desempenho das aves (MAIORKA et al., 2000). Nesse sentido, a suplementação de glutamina parece ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento da mucosa na primeira semana pós-eclosão, por apresentar grande influência sobre a maturação intestinal, como observado no presente estudo.

Na fase inicial de criação das aves que compreendeu 1 a 21 dias, as variáveis de desempenho não apresentaram nenhuma diferença ($p>0,05$) quando as aves foram

suplementadas com glutamina, ácido glutâmico e a combinação de glutamina e ácido glutâmico. No entanto, a conversão alimentar apresentou diferença ($p < 0,05$), sendo que as aves alimentadas com 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico tiveram melhores valores de conversões alimentares quando comparado às aves sem suplementação, não diferindo, pois, dos demais tratamentos que continham glutamina e ácido glutâmico isolados (Tabela 2). Resultados semelhantes a este estudo, foram encontrados por Avellaneda et al. (2008) que em experimento incluindo diferentes níveis da combinação de glutamina e ácido glutâmico nas proporções 0,5; 1,0 e 1,5% na ração de frangos de corte, obtiveram um melhor valor de conversão alimentar no período de 1 a 25 dias de idade. De maneira parcialmente semelhante aos resultados desta pesquisa, Nogueira et al. (2010) verificaram diferenças no desempenho, quando as aves foram suplementadas com glutamina nas proporções 1 e 2% e sem suplementação e submetidos a um estresse térmico.

Discordando dos resultados do presente trabalho, em seus estudos, Fisher da Silva (2001) e Luquetti, (2005), quando adicionaram 1,0% de glutamina à ração não encontraram diferenças para o desempenho de frangos de corte, embora com a adição deste aminoácido à dieta foi possível verificar efeito sobre outras características fisiológicas como (altura de vilo e profundidade de cripta) quando foram submetidas a uma condição de estresse.

Tabela 2. Ganho de peso médio (GP), peso final (PF), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), viabilidade (VB) e índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos de corte aos 7, 21, 35 e 42 dias de idade recebendo glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação na dieta.

Variáveis	1-7 dias						
	Tratamentos				Médias	Prob	CV (%)
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
GP(g)	137,22	139,81	139,10	140,47	139,15	0,484	2,68
PF(g)	181,40	183,90	183,33	184,72	183,33	0,479	2,04
CR (g)	155,28	154,60	148,90	145,30	151,00	0,095	4,96
CA (g/g)	1,13A	1,06B	1,07B	1,03B	1,07	0,001	3,34
1-21 dias							
GP (g)	913,48	935,60	932,81	926,86	927,20	0,160	1,88
PF (g)	957,64	979,70	977,06	971,11	971,40	0,163	1,80
CR (g)	1316,02	1313,01	1316,52	1269,72	1303,82	0,053	2,46
CA (g/g)	1,43A	1,39AB	1,41AB	1,37B	1,40	0,012	2,23
VB (%)	98,89	98,89	99,45	100,00	99,30	0,472	1,40
1-35 dias							
GP (g)	2224,22	2252,80	2237,13	2198,74	2228,22	0,091	1,60
PF (g)	2268,40	2296,89	2281,40	2242,98	2272,41	0,091	1,56
CR (g)	3514,08	3486,93	3514,75	3499,16	3503,73	0,904	2,15
CA (g/g)	1,59A	1,55B	1,58AB	1,60A	1,58	0,011	1,77
VB (%)	96,67	98,33	98,33	98,33	97,91	0,468	2,22
1-42 dias							
GP (g)	2764,60	2753,86	2770,34	2763,10	2762,98	0,973	2,21
PF (g)	2808,76	2797,95	2814,60	2807,35	2807,16	0,972	2,17
CR (g)	4722,08	4663,93	4702,25	4693,64	4695,48	0,795	2,16
CA (g/g)	1,73	1,69	1,74	1,75	1,73	0,168	2,62
VB (%)	95,56	98,33	95,00	94,44	95,83	0,175	3,27
IEP	363,30	381,66	360,00	355,00	360,00	0,205	5,87

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob= Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

Não foi observado efeito dos diferentes tratamentos ($p > 0,05$) para o ganho de peso, peso final e consumo de ração das aves no período de 1 a 35 dias. A conversão alimentar foi influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$), apresentando-se melhor para as aves que receberam dietas contendo 1% de glutamina e não diferindo apenas daquelas que foram suplementadas com 1% de ácido glutâmico. Estes resultados discordam dos encontrados por Sakamoto (2009) que não obteve diferenças para esta fase quando

suplementou as rações com diferentes níveis de glutamina (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e a combinação de glutamina e ácido glutâmico (0,5; 1,5; 3,0 e 5,0%). Da mesma forma, durante esta fase as aves suplementadas com glutamina apresentaram um valor melhor de conversão alimentar, mostrando sua atuação sobre a mucosa intestinal, aumentando a capacidade funcional do intestino das aves em digerir e absorver os nutrientes da dieta, permitindo melhor desempenho (MAIORKA et al., 2000).

No entanto no período total de criação (de 1 a 42 dias de idade) não foi observado efeito dos tratamentos sobre nenhuma das características de desempenho estudadas ($p > 0,05$); de maneira semelhante aos resultados encontrados por Pelícia et al. (2011), que utilizaram a associação de glutamina e ácido glutâmico em dietas para frangos de corte.

Resultados observados no presente trabalho discordam dos constatados por Souza et al. (2010), quando suplementaram a ração com glutamina (sem suplementação, 1 e 2%) e submeteram a um estresse térmico, verificando melhor desempenho para as aves. Por outro lado, Lora et al. (2006) utilizando a associação de glutamina e ácido glutâmico, verificaram melhores resultados de desempenho para as aves suplementadas.

Durante a pesquisa foi induzido um desafio sanitário natural, através da utilização de cama reutilizada, o que pode ter levado uma melhora da conversão alimentar das aves suplementadas com aminoácidos sintéticos em relação às aves sem suplementação, somente nas fases pré-inicial, inicial e crescimento. Embora, para o período total, a suplementação de aminoácidos sintéticos nas dietas não levou a um efeito benéfico no desempenho das aves.

Biometria Entérica

Em relação ao desenvolvimento intestinal de frangos de corte aos 7 dias de idade, pode-se observar que os valores médios do comprimento do intestino e seus segmentos (Tabela 3) não foram influenciados pelos tratamentos ($p>0,05$). Os resultados deste estudo são semelhantes aos encontrados por Sakamoto (2009), quando utilizaram diferentes níveis de glutamina (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e a combinação de glutamina e ácido glutâmico (0,5; 1,5; 3,0 e 5,0%) em dietas para frangos de corte.

Não foi observado influência dos diferentes tratamentos ($p>0,05$) para o peso relativo do intestino e de seus segmentos (Tabela 3). Os resultados do presente trabalho são discordantes dos encontrados por Sakamoto (2009), pois encontrou diferença para o peso relativo do intestino delgado, utilizando diferentes níveis de glutamina e da combinação de glutamina e ácido glutâmico.

Tabela 3. Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade

Variáveis	Comprimento do intestino e seus segmentos (cm)				Médias	Prob	CV(%)
	Tratamentos						
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Duo	17,07	16,88	17,02	16,62	16,90	0,740	8,26
Jej	37,15	37,65	37,32	36,72	37,21	0,930	11,97
Ileo	33,65	34,05	34,92	33,40	34,00	0,580	10,82
Ceco	7,75	7,77	7,50	7,70	7,68	0,628	9,52
Colon	5,10	5,20	4,87	5,20	5,09	0,406	13,81
Total	100,73	101,55	101,64	99,65	100,89	0,835	7,68
ID	87,88	88,58	89,27	86,75	88,12	0,742	8,48
IG	12,85	12,97	12,37	12,90	12,77	0,282	8,44
Peso Relativo ¹ do intestino e seus segmentos (%) ¹							
PR duo	2,43	2,46	2,44	2,39	2,43	0,899	10,76
PR jej	3,27	2,89	2,99	3,06	3,05	0,106	16,08
PR íleo	2,20	2,16	2,28	2,15	2,20	0,573	15,12
PR Cecos	0,86	0,94	0,87	0,85	0,88	0,420	21,42
PR Colon	0,35	0,38	0,34	0,37	0,36	0,573	27,52
PR Total	9,12	8,84	8,94	8,83	8,93	0,672	9,31
PR ID	7,91	7,52	7,72	7,61	7,69	0,448	10,34
PR IG	15,46	17,80	15,83	16,11	16,30	0,162	21,37

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); ¹ % em relação ao peso vivo; L-GLn= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; Duo=duodeno, Jej=jejuno ID=Intestino Delgado; IG=Intestino grosso; PR= Peso relativo, ¹ porcentagem em relação ao peso vivo.

Aos 14 dias de idade, os comprimentos do intestino delgado e grosso das aves (Tabela 4), não foram influenciados pelos tratamentos ($p > 0,05$), exceto para o comprimento do cólon, sendo menor para as aves que foram suplementadas com o tratamento que continha 1% de ácido glutâmico, em relação ao tratamento controle, e não diferindo dos demais tratamentos.

Em relação ao peso relativo dos intestinos e seus segmentos, nesta mesma idade de criação, os tratamentos não apresentaram efeito sobre as variáveis ($p > 0,05$), semelhante aos resultados encontrados por Sakamoto (2009).

Por outro lado, Bartell & Batal (2007) em estudos com a adição de diferentes proporções (1 e 4%) de glutamina em água e ração para frangos de corte, encontraram maiores pesos relativos para os segmentos do duodeno e jejuno.

Tabela 4. Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade

Variáveis	Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)				Médias	Prob	CV (%)
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Duo	19,77	20,55	20,35	20,85	20,38	0,337	9,31
Jej	42,72	45,67	43,35	46,15	44,47	0,186	13,27
Ileo	39,17	41,05	40,07	40,57	40,21	0,788	15,03
Ceco	9,90	10,25	10,07	10,45	10,17	0,419	10,62
Colon	5,30B	5,67AB	5,22A	5,77AB	5,49	0,035	12,75
Total	116,87	123,20	119,07	123,80	120,74	0,228	10,14
ID	101,67	107,27	103,77	107,58	105,07	0,308	10,98
IG	15,20	15,92	15,30	16,22	15,66	0,087	9,36
Peso Relativo ¹ do intestino e de seus segmentos (%)							
PR duo	1,75	1,73	1,85	1,82	1,79	0,101	10,01
PR jej	2,03	1,99	2,11	2,12	2,06	0,267	11,46
PR íleo	1,62	1,60	1,67	1,69	1,65	0,596	14,52
PR Cecos	0,72	0,70	0,67	0,73	0,70	0,518	20,02
PR Colon	0,26	0,25	0,25	0,28	0,26	0,220	15,66
PR Total	6,38	6,28	6,56	6,65	6,47	0,142	8,39
PR ID	5,41	5,33	5,64	5,63	5,50	0,091	8,63
PR IG	0,97	0,96	0,92	1,01	0,97	0,334	16,14

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; Duo=duodeno, Jej=jejuno; ID=Intestino Delgado; IG=Intestino grosso; PR= Peso relativo, ¹ porcentagem em relação ao peso vivo.

Aos 42 dias de idade, os comprimentos do intestino delgado e de seus segmentos, bem como o peso relativo (Tabela 5) não foram influenciados pelos tratamentos ($p > 0,05$). Estes dados são semelhantes aos encontrados por Zavarize et al. (2011), que também utilizaram glutamina e nucleotídeos na ração de frangos criados em sistema alternativo. Da mesma forma Pelícia (2011) ao realizar experimentos com frangos de corte e utilizando a associação de glutamina e ácido glutâmico não verificou diferença para a biometria entérica.

Em trabalho realizado por Sakamoto (2009) utilizando diferentes níveis de glutamina e a associação de glutamina e ácido glutâmico em dietas para frangos de corte e Jazideh et al. (2013), utilizando também níveis de glutamina e em estresse por calor, não encontraram diferença para o comprimento e peso relativo do intestino aos 42 dias.

Tabela 5. Comprimento e peso relativo do intestino e seus segmentos de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade

Comprimento do intestino e de seus segmentos (cm)							
Variáveis	Tratamentos				Médias	Prob	CV (%)
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Duo	25,12	24,32	24,65	24,42	24,63	0,829	11,93
Jej	60,72	59,55	63,07	60,77	61,03	0,529	12,52
Ileo	61,30	63,05	60,27	64,07	62,17	0,581	15,17
Ceco	17,30	17,37	17,75	17,45	17,47	0,912	12,02
Colon	7,67	7,37	7,35	7,52	7,48	0,702	13,09
Total	172,12	171,67	173,10	174,25	172,80	0,973	10,86
ID	147,15	146,92	148,00	149,27	147,84	0,972	11,61
IG	24,97	24,75	25,10	24,96	24,95	0,980	10,54
Peso Relativo ¹ do intestino e de seus segmentos (%)							
PR duo	0,68	0,65	0,69	0,66	0,67	0,226	12,96
PR jej	0,95	0,94	0,96	1,20	1,01	0,629	73,18
PR íleo	0,80	0,87	0,89	0,84	0,85	0,291	18,26
PR Cecos	0,45	0,44	0,46	0,44	0,45	0,968	23,06
PR Colon	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,879	17,38
PR Total	3,01	3,03	3,13	2,95	3,01	0,521	12,86
PR ID	2,44	2,46	2,55	2,38	2,46	0,482	14,20
PR IG	0,019	0,018	0,018	0,019	0,018	0,879	17,38

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; Duo=duodeno, Jej=jejuno; ID=Intestino Delgado; IG=Intestino grosso; PR= Peso relativo; ¹ porcentagem em relação ao peso vivo.

Morfometria da parede do intestino delgado

Aos 7 dias de idade, as diferentes túnicas que compõem a mucosa do duodeno não foram influenciadas pelos tratamentos (Tabela 6), exceto a túnica serosa que apresentou maior espessura para as aves que receberam a suplementação de 1% de ácido glutâmico, diferindo daquelas que foram suplementadas com 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico ($p < 0,05$), enquanto que para os demais tratamentos não

foram observado diferenças significativas ($p > 0,05$). Para o segmento do jejuno, a camada da mucosa foi influenciada, sendo maior para o tratamento com 1% de ácido glutâmico em comparação ao tratamento que continha a combinação de glutamina e ácido glutâmico, não diferindo dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Enquanto que o íleo, não foi observado efeito dos tratamentos ($p > 0,05$) sobre as camadas que compõem a parede deste segmento (Figura 1).

Na literatura pertinente foi possível verificar aos 7 dias de idade, diferenças para a altura de vilos em segmentos de duodeno e íleo, quando utilizaram dietas suplementadas com 1% de glutamina para frangos de corte, e para o segundo segmento do intestino delgado, o jejuno, nessa mesma fase de criação não foi constatado diferença para a altura de vilosidade (MAIORKA et al., 2000). Em estudos similares, diferindo apenas a concentração de glutamina (1,5%) e a combinação de glutamina e ácido glutâmico (3,0%) utilizadas na fase pré-inicial, foi verificado melhora para a morfometria dos segmentos de duodeno e íleo (SAKAMOTO, 2009). Por outro lado, Bartell & Batal (2007), em experimento com frangos de corte na mesma fase de criação, suplementando dietas com glutamina (1 e 4%), observaram maiores alturas dos vilos para o duodeno e jejuno.

Tabela 6. Espessura (μm) das diferentes camadas constituintes da parede do intestino delgado de frangos de corte aos 7 dias de idade suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação

Tratamentos	Variáveis (μm)			
	Duodeno			
	Mucosa	M. Interna	M. Externa	Túnica Serosa
Controle	1203,94	158,61	56,30	32,90AB
L-Gln (1%)	1114,37	144,66	62,22	34,73AB
L-Glu (1%)	1303,95	144,86	57,15	40,64A
Gln/Glu (2%)	1173,46	161,52	53,25	26,51B
Médias	1198,93	152,41	57,23	33,70
Prob	0,097	0,676	0,732	0,021
CV(%)	9,35	18,18	22,13	18,61
	Jejuno			
Controle	837,22AB	126,30	59,56	24,06
L-Gln (1%)	840,29AB	120,58	52,60	23,96
L-Glu (1%)	979,73A	151,62	56,24	26,63
Gln/Glu (2%)	724,48B	155,50	54,04	21,88
Médias	845,43	138,50	55,60	24,14
Prob	0,037	0,376	0,854	0,207
CV(%)	14,14	27,07	23,97	13,80
	Íleo			
Controle	666,60	144,18	72,66	23,23
L-Gln (1%)	589,96	158,51	64,22	25,68
L-Glu (1%)	696,08	207,66	78,01	27,21
Gln/Glu (2%)	665,28	178,99	72,11	23,67
Médias	654,50	172,33	71,75	24,95
Prob	0,106	0,306	0,793	0,803
CV(%)	10,01	31,25	30,18	28,78

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; M= muscular.

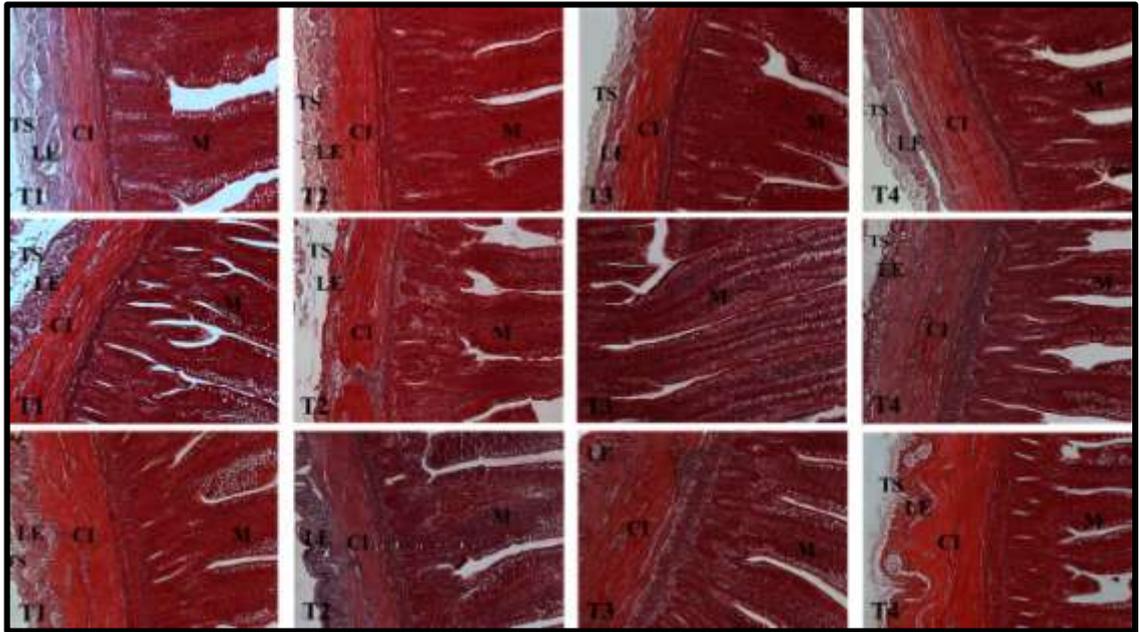


Figura 1: Fotomicrografia de segmentos do intestino delgado de frangos de corte aos 7 dias de idade. (M) Túnica mucosa, (CI) Túnica muscular circular interna, (LE) Túnica muscular longitudinal externa, T1: tratamento controle, T2: tratamento com suplementação de 1% de glutamina, T3: tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: segmento de duodeno; na linha 2: segmento de jejuno e na linha 3: segmento de íleo. Tricrômico de Masson, 20X.

No período de 14 dias de idade, a espessura das diferentes camadas (Tabela 7 e Figura 2), que compõem os segmentos do intestino delgado não foi influenciada ($p>0,05$) pelos tratamentos ($p>0,05$). Os resultados deste estudo são semelhantes aos encontrados por Maiorka et al. (2000) para essa mesma fase de criação, que ao utilizar 1% de glutamina em dietas para frangos de corte, não encontraram diferenças para a altura dos vilos, porém a profundidade da cripta foi influenciada entre os tratamentos e os segmentos do intestino delgado.

Estudos realizados com suplementação de glutamina para frangos de corte em diferentes dietas contendo alimentos de origem animal e vegetal encontraram influência deste aminoácido sobre a altura do vilo nos distintos segmentos do intestino delgado (MARTINEZ et al., 2012). Já, Nascimento (2010), encontrou diferença para a profundidade de cripta quando utilizou diferentes níveis de glutamina em dietas para

frangos de corte, aos 18 dias de idade, enquanto Sakamoto (2009), utilizando glutamina e a combinação de glutamina e ácido glutâmico observou diferença para a altura de vilos em segmentos de duodeno e íleo, sendo que para o jejuno não foi observada influência da adição de glutamina isolada ou associada ao ácido glutâmico. Da mesma forma Bartell & Batal (2007), objetivando determinar o tempo necessário em que 1% de glutamina exerceria melhora sobre o desenvolvimento intestinal das aves, administrando o aminoácido em diferentes períodos de idade, encontraram maiores alturas das vilosidades para o duodeno e jejuno, independente do tempo de fornecimento da dieta.

Tabela 7. Espessura (μm) das diferentes camadas constituintes da parede do intestino delgado de frangos de corte aos 14 dias de idade suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação

Tratamentos	Variáveis (μm)			
	Duodeno			
	Mucosa	M. Interna	M. Externa	Túnica Serosa
Controle	1676,77	168,48	54,35	37,63
L-Gln (1%)	1623,66	164,86	74,88	35,24
L-Glu (1%)	1709,58	191,51	69,44	35,76
Gln/Glu (2%)	1535,65	197,16	71,77	30,84
Médias	1636,42	180,50	67,61	34,87
Prob	0,334	0,430	0,193	0,692
CV(%)	9,42	20,35	22,65	26,23
	Jejuno			
Controle	1279,07	205,70	61,90	23,15
L-Gln (1%)	1351,64	189,80	61,60	31,43
L-Glu (1%)	1225,17	179,25	75,68	28,78
Gln/Glu (2%)	1192,70	208,30	73,50	26,14
Médias	1262,14	195,76	68,17	27,25
Prob	0,257	0,791	0,447	0,266
CV(%)	10,11	26,56	25,25	23,80
	Íleo			
Controle	861,69	195,86	88,67	30,02
L-Gln (1%)	875,82	228,25	90,79	31,11
L-Glu (1%)	896,00	197,30	90,24	29,08
Gln/Glu (2%)	830,11	251,92	81,52	24,94
Médias	865,90	218,33	87,81	28,80
Prob	0,807	0,479	0,943	0,368
CV(%)	12,55	29,63	30,75	19,74

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; M= muscular.

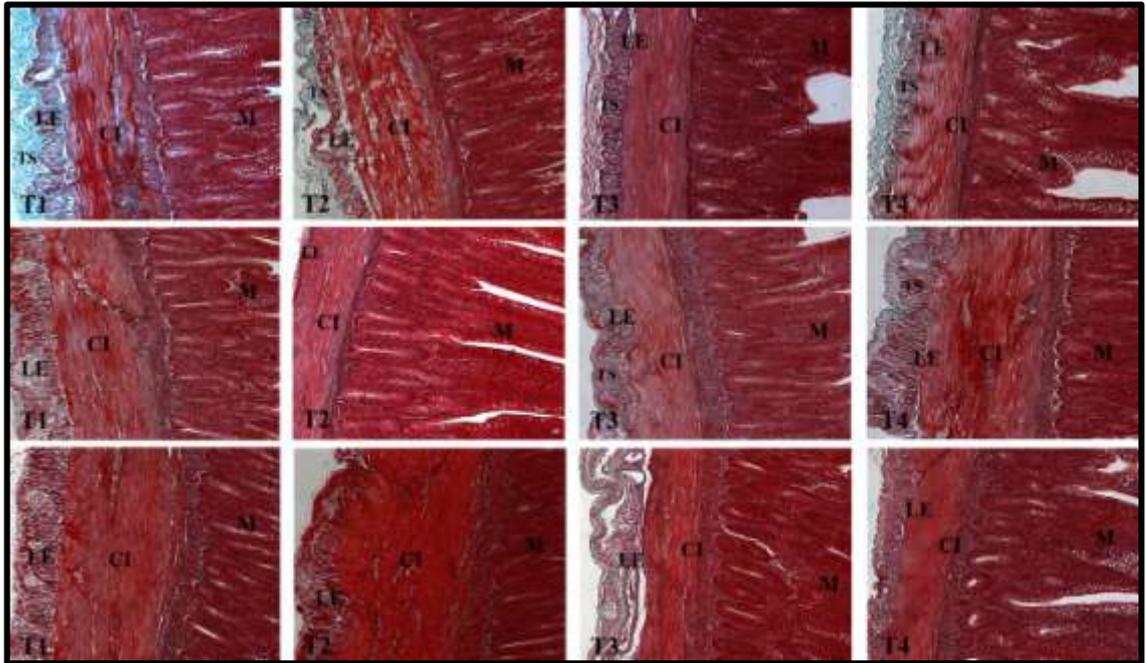


Figura 2: Fotomicrografia de segmentos do intestino delgado de frangos de corte aos 14 dias de idade. (M) Túnica mucosa, (CI) Túnica muscular circular interna, (LE) Túnica muscular longitudinal externa, T1: tratamento controle, T2: tratamento com suplementação de 1% de glutamina, T3: tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: segmento de duodeno; na linha 2: segmento de jejuno e na linha 3: segmento de íleo. Tricrômico de Masson, 20X.

Os valores da espessura das diferentes camadas do duodeno e íleo não foram influenciadas pelos tratamentos ($p > 0,05$); enquanto que para o segmento de jejuno, a túnica serosa apresentou uma maior espessura para as aves suplementadas com o tratamento de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico e a dieta controle, diferenciando dos demais tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 8 e Figura 3).

Para esta mesma fase de criação, os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados por Zavarize et al. (2011), quando suplementaram dietas com glutamina e nucleotídeos para frangos de corte. Estes pesquisadores justificam que a maturação intestinal de frangos de corte ocorre nas duas primeiras semanas de vida, o que pode explicar a ausência de efeito da glutamina e nucleotídeos na morfometria intestinal aos 42 dias de idade. De forma contrária, Sakamoto (2009) constatou

influência dos tratamentos sobre a morfometria entérica nos diferentes segmentos do intestino delgado em experimentos com glutamina e a associação de glutamina e ácido glutâmico adicionados às dietas de frangos de corte.

Tabela 8. Espessura (μm) das diferentes camadas constituintes da parede do intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação

Tratamentos	Variáveis (μm)			
	Duodeno			
	Mucosa	M. Interna	M. Externa	Túnica Serosa
Controle	2071,10	265,45	92,85	53,72
L-Gln (1%)	1948,12	286,33	113,17	50,30
L-Glu (1%)	1962,58	251,60	88,37	54,97
Gln/Glu (2%)	1990,10	306,76	118,23	59,92
Médias	1993,24	277,53	103,00	54,73
Prob	0,896	0,258	0,236	0,846
CV(%)	13,77	16,02	25,80	31,34
	Jejuno			
Controle	1803,48	256,06	82,53	40,50A
L-Gln (1%)	1796,54	281,75	95,50	29,54B
L-Glu (1%)	1553,32	276,84	80,77	28,21B
Gln/Glu (2%)	1594,96	265,13	78,74	40,45A
Médias	1687,07	269,94	84,38	34,67
Prob	0,343	0,891	0,396	0,032
CV(%)	15,95	21,20	19,54	22,35
	Íleo			
Controle	1168,83	310,23	130,88	34,45
L-Gln (1%)	1356,97	350,10	128,05	31,84
L-Glu (1%)	1147,48	252,01	93,92	29,45
Gln/Glu (2%)	1321,34	283,38	111,96	32,72
Médias	1247,65	298,93	116,20	32,11
Prob	0,138	0,123	0,221	0,826
CV(%)	13,20	20,80	25,66	26,60

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln= Glutamina; L-Glu= Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação; M= muscular.

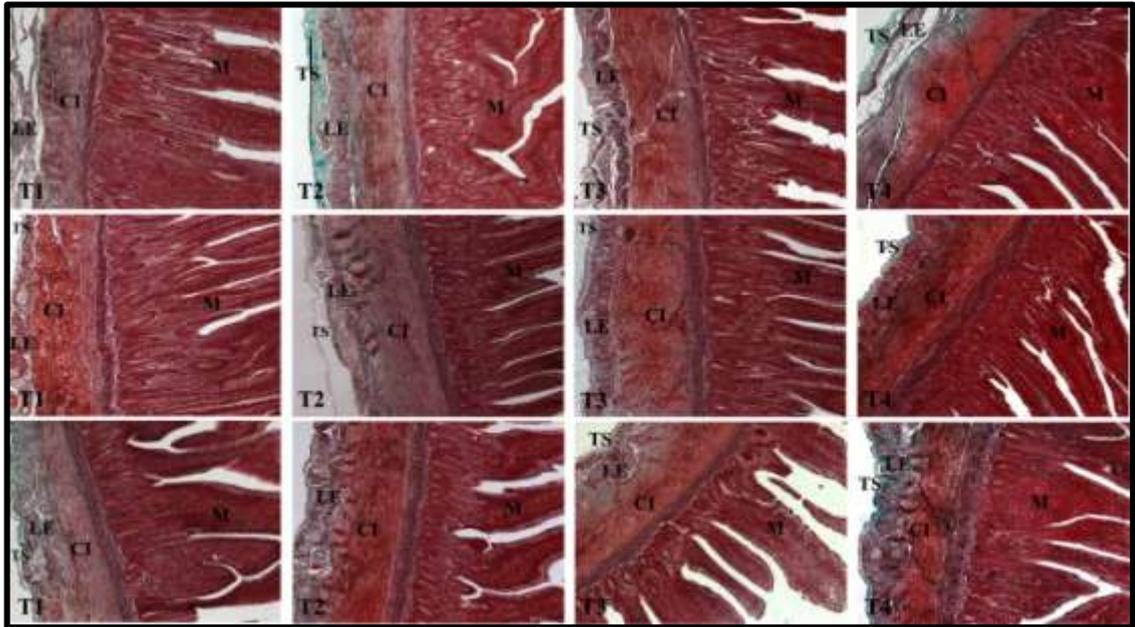


Figura 3: Fotomicrografia de segmentos do intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade. (M) Túnica mucosa, (CI) Túnica muscular circular interna, (LE) Túnica muscular longitudinal externa, T1: tratamento controle, T2: tratamento com suplementação de 1% de glutamina, T3: tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: segmento de duodeno; na linha 2: segmento de jejuno e na linha 3: segmento de íleo. Tricrômico de Masson, 10X.

CONCLUSÃO

A adição de aminoácidos sintéticos na ração para frangos de corte influenciaram o desempenho das aves interferindo na conversão alimentar no período pré-inicial, inicial e crescimento, não afetando o período total de criação das aves. A biometria entérica não foi influenciada pelos tratamentos, enquanto que a suplementação com 1% de ácido glutâmico, aos 7 dias de idade, melhorou a morfometria da camada mucosa no segmento do jejuno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVELLANEDA, Y.; HERNÁNDEZ, J.; ARIZA, C.; AFANADOR, T. Efecto de la suplementación del glutamina y L-glutamato (Aminogut®) sobre el crecimiento temprano de pollos de engorde. **Revista Medicina Veterinária e Zootenia.**, v.55, p.77-90, 2008.

- BARTELL, S. M.; BATAL, A.B. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. **Poultry Science**. V.86, p.1940-1947, 2007.
- BEHMER, O.A; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2 ed. Barueri, Editora Manole, 2003, 331p.
- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. **Estrutura funcional do trato digestório**. In: Macari M.; Furlan R.L.; Gonzales E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: Funep; p. 75-96, 2002.
- CAPUTO, L.F.G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P.P.A. **Técnicas histológicas**. In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politecnica de Saúde Joaquim Venâncio, v.2, p. 89-188, 2010.
- JAZIDEH, F.; DANESHYAR, M.; FARHOOMAND, P.; NAJAFI G. The effects of dietary glutamine supplementation on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens reared under hot condition. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, nº-1.210-32, 2013.
- FISCHER DA SILVA, A.V. **Efeitos da restrição alimentar precoce e da glutamina no desempenho e na mucosa intestinal de frangos**. 2001.77f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- LORA. A.G.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; PÁEZ LE GATTÁS, G.; MESSIAS, R.K.G. Níveis de inclusão de AminoGut[®] em rações para frangos de corte. Em Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 2006
- LUQUETTI, B.C. **Efeito da vacinação contra coccidiose aviária e da suplementação de glutamina ou prebiótico sobre a mucosa intestinal em frangos**. 2005. 106f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; SANTIN, E.; BORGES, A.S.; BOLELI, I.C.; MACARI M. Influência da suplementação de Glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.487-490. 2000.
- MAIORKA, A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento e Reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, p.113-123, 2002.
- MARTINEZ, K.L.A.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H., ARAÚJO, I.C.S.; ANDRADE, M.A. Suplementação de glutamina em dietas

elaboradas com ingredientes de origem vegetal e animal para pintos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1707-1716, 2012.

MENDES, A.A.; PATRÍCIO, I.S. Controle, registros e avaliação do desempenho de frangos de corte. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. FACTA: Campinas, São Paulo, p.323-334, 2004.

NASCIMENTO, G.M. **Suplementação da L-Glutamina em ração sem agente anticoccidiano para frangos: Desempenho e Desenvolvimento da mucosa intestinal**. 2010. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

NOGUEIRA W.C.L.; SOUZA, M.G.; ANTONIO, J.; TORRES, K.A.A.; MACARI, M.; FURLAN, R.L. Suplementação de Glutamina para frangos de corte de 1 a 21 dias criados em diferentes temperaturas ambientes. Em 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Salvador, BA. **Anais...** CDRom, 2010.

NOY, Y.; SKLAN, D. Metabolic responses to early nutrition. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v.7, n.4; p.437-451. 1998.

PELICIA, V.C.; SARTORI, J.R.; ARAUJO, P.C.; STRADIOTTI, A.C.; POLYCARPO, G.V.; SOUZA, I.M.G.P.; VERCESE, F. Glutamina mais ácido glutâmico e aditivos fitogênicos na dieta inicial de frangos de corte alternativos criados sobre cama reutilizada. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnológica Avícolas, Santos – SP, FACTA, **Anais...** CDRom, 2011.

PELICIA, V.C. **Glutamina mais ácido glutâmico e aditivos fitogênicos nas dietas de frangos de corte criados no sistema alternativo de produção**. 2011. 119f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2011.

REEDS, P.J.; BURRIN, D.G. Glutamine and the bowel. **Journal of Nutrition**, v.131, p. 2505S-2508S.

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

SAKAMOTO, M. I. **Desempenho, desenvolvimento e atividade enzimática da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com glutamina e nucleotídeos**. 2009. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's Guide**: Version 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.

SELL, J.L. Physiological limitations and potential for improvement in gastrointestinal tract function of poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.5, p.96-101, 1996.

SOUZA, L.F.A., SOUZA, M.G., MORITA, V.M., SILVA, M.K., MACARI, M., FURLAN, R.L. Estresse térmico e suplementação de glutamina para frangos de corte. Em 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia Salvador, BA. **Anais...** CDRom, 2010.

ZAVARIZE, K.C.; SARTORI, J.R.; PELÍCIA, V.C.; PEZZATO, A.C.; ARAUJO, P.C.; STRADIOTTI, A.C.; MADEIRA, L.A. Glutamina e nucleotídeos na dieta de frangos de corte criados no sistema alternativo. **Arquivos de Zootecnia**. v. 60 (232), p. 913-920. 2011.

CAPÍTULO 3:**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA INTEGRIDADE INTESTINAL EM
FRANGOS DE CORTE COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM
GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTAMICO**

AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA INTEGRIDADE INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO

RESUMO: Com objetivo de avaliar a integridade intestinal, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) em segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com aminoácidos sintéticos na ração, foram alojados 340 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®], com densidade populacional de 12 aves/m². O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições de 17 aves cada. Os tratamentos foram: 1- Ração basal; 2- Ração basal com suplementação de 1% de glutamina; 3- Ração basal com suplementação de 1% de ácido glutâmico; 4- Ração basal com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Foram sacrificadas 60 aves, sendo que em cada período avaliado aos 7, 14 e 42 dias de idade apenas 20 aves foram eutanasiadas por vez para avaliação das análises da integridade intestinal (MEV), em que foram coletados segmentos do duodeno, jejuno e íleo de cinco aves por tratamento. Para a avaliação da microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram coletados segmentos do duodeno de oito aves por tratamento, totalizando 32 aves por período avaliado. A densidade dos vilos aos 7 dias de idade foi influenciada pelos tratamentos no segmento do jejuno, sendo que o segmento intestinal das aves suplementadas com 1% de ácido glutâmico apresentou maior número de vilos, enquanto que os demais segmentos não foram influenciados pelos tratamentos. Já a integridade dos vilos foi melhor preservada nas aves que receberam a suplementação com 1% de glutamina. A densidade dos vilos aos 14 e 42 dias de idade não foi influenciada pelos tratamentos, em nenhum dos segmentos intestinais. Para a perda de epitélio, foi possível observar de uma forma geral, que a glutamina mostrou melhores resultados nas fases iniciais de criação. Para as variáveis avaliadas na microscopia de transmissão, não foram evidenciadas diferenciação entre os tratamentos. Assim, a adição de aminoácidos sintéticos na ração de frangos de corte influenciou a densidade de vilos, preservando a integridade, embora não atuaram nas células absortivas da mucosa intestinal.

Palavras-chave: aves, enterócitos, integridade, intestino delgado, mucosa entérica.

ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF INTESTINAL INTEGRITY IN BROILERS DIETS SUPPLEMENTED WITH GLUTAMINE AND GLUTAMIC ACID

ABSTRACT: In order to evaluate the intestinal integrity, through scanning electronic microscopy (SE) and transmission (TE) in broilers supplemented with synthetic amino acids in feed, 340 chicks one day old, male, Cobb[®], with a density population of 12 birds/m² were allocated. The design was completely randomized with four treatments and five replicates of 17 birds each. The treatments were: 1 - basal ration; 2 - basal ration supplemented with 1% glutamine; 3 - basal ration supplemented with 1% glutamic acid; 4 - basal ration supplemented with 2% of the combination of glutamine and glutamic acid. Were sacrificed 60 birds, and that in each period evaluated at 7, 14 and 42 days of age only 20 birds were euthanized to evaluate the analysis integrity intestinal (SE), that they segments of the duodenum, jejunum and ileum five birds per treatment were collected. For transmission electronic microscopy (TE) segments of the duodenum of eight birds per treatment were collected, totaling 32 birds by valued period. The density villis at 7 days of age were influenced the treatments the jejunum segment, and that the birds supplemented with in the treatment with 1 % glutamic acid showed more number villis. The density villis of other segments were not affected by treatments. Have the integrity villis with treatment with 1% glutamine was better preserved. The density villis at 14 and 42 days of age, in any the intestinal segments was not affected by treatments. For the loss of epithelium, was in general observed that the glutamine showed better results in the early stages of creation. For variables valued in transmission microscopy no difference treatments were found. Thus the addition of synthetic amino acids in ration broiler influenced the density of villi, preserving the integrity, though not acted in the absorptive cells of the intestinal mucosa.

Keywords: birds, enterocytes, integrity, small intestine, enteric mucosa

INTRODUÇÃO

A maturação funcional do intestino envolve mudanças morfológicas e fisiológicas, responsáveis pelo aumento na área de superfície de digestão e de absorção. As alterações morfológicas mais significativas são o aumento no comprimento do intestino, na altura e densidade dos vilos e no número de enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. As alterações fisiológicas estão relacionadas com o aumento na capacidade de digerir e absorver os nutrientes presentes no lúmen intestinal, devido ao aumento na produção de enzimas pancreáticas de membrana, bem como de transportadores de membrana (MAIORKA et al., 2002).

A densidade e o tamanho dos vilos, bem como dos microvilos, conferem características próprias a cada segmento do intestino delgado. Assim em poedeiras comerciais, por exemplo, o aumento na altura dos vilos e profundidade de cripta é mais intenso no duodeno nos primeiros seis dias de vida pós-eclosão; e aos 10 dias, no jejuno e íleo (UNI et al., 1995, 1996, 1998b). Em frangos de corte, por sua vez, um aumento mais acentuado na altura dos vilos, no duodeno, começa *in ovo*, do 17º dia de incubação até o 7º dia pós-eclosão. No jejuno e íleo, o crescimento continua até o 14º dia, resultando no número de enterócito por vilo e a profundidade de cripta também aumenta, sendo maior no duodeno e menor no íleo (UNI et al., 1998a).

Segundo Maioka et al. (2002), a taxa de renovação celular, bem como a densidade e tamanho dos vilos não são os mesmos ao longo da extensão do intestino delgado. O duodeno, além de possuir maior altura do vilo, também tem maior taxa de renovação da mucosa intestinal em relação aos demais segmentos. Esse rápido *turnover* duodenal pode ser explicado pelo fato de ser essa uma região extremamente importante para o processo digestivo, pois é onde ocorre a liberação das secreções biliares e pancreáticas. Por outro lado, é o primeiro segmento do intestino a receber estímulos

físicos, químicos e hormonais, desencadeados pela presença de nutrientes no lúmen, sendo considerada a presença de nutrientes um fator estimulante do crescimento dos vilos e criptas (MORAN Jr, 1985). Assim o desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento da altura e número de vilos, que por sua vez, estão diretamente relacionados com o número dos diferentes tipos de células presentes no epitélio da mucosa entérica. Com isso a ação de fatores tróficos é de grande importância para estimular o desenvolvimento intestinal.

Determinados nutrientes presentes no alimento entre eles os aminoácidos, como a glutamina, tem sido considerados como combustíveis para o crescimento da mucosa do intestino delgado. O efeito da glutamina sobre a reconstituição da mucosa intestinal, após alguma injúria, tem despertado a atenção, devido ao fato desse aminoácido ser o principal metabólito que nutre os enterócitos (FISHER DA SILVA, 2001). Sendo assim, este aminoácido é reconhecido como substrato energético vital para as células com rápida divisão como as células intestinais. Enquanto que o ácido glutâmico por ser precursor da glutamina, acredita-se apresentar vias semelhantes no desenvolvimento intestinal e, portanto, apresentar efeito similar ao da glutamina.

Desta forma, o objetivo da condução do presente estudo foi avaliar a integridade intestinal de frangos de corte através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão nos diferentes períodos, com dietas suplementadas com glutamina, ácido glutâmico e a combinação da glutamina e ácido glutâmico.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental, as dietas e o manejo utilizados no experimento foram descritos no capítulo anterior “Material e Métodos”, utilizado no experimento II. O número de aves foi diferente para estas análises. Para a avaliação das análises de

microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram sacrificadas um total de 60 aves, sendo que em cada período aos 7, 14 e 42 dias de idade foram sacrificadas por vez 20 aves, que foram transportadas para o abatedouro experimental da FMVZ/UNESP/Botucatu e após jejum de 6 horas, insensibilizadas por eletronarcose e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. Posteriormente foram coletados segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e acondicionadas em potes com fixador glutaraldeído. Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram sacrificadas 32 aves por período analisado aos 7, 14 e 42 dias de idade, totalizado 96 aves, em que foram coletados o segmento do duodeno e acondicionadas em potes apropriados com fixador.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram coletadas amostras dos diferentes segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) de cinco aves por tratamento, totalizando 20 aves por período avaliado (7, 14 e 42 dias de idade), as quais foram processadas no laboratório do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB – UNESP. As amostras foram abertas longitudinalmente, esticadas e brevemente lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) com a finalidade de remover o conteúdo intestinal. Os segmentos foram fixados por 24 horas a 4 °C em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada e fixadas por 30 minutos em tetróxido de ósmio 0,5% em água deionizada. O material foi desidratado em uma série crescente de etanol (7,5 % a 100%), e em seguida submetido à secagem com dióxido de carbono líquido em um aparelho de ponto crítico de secagem Balzers CPD-020, montados em “stubs”, e metalizados com 10 nm de ouro usando um Metalizador SCD-050 da Bal-Tec. Após o processamento as amostras foram fotografadas, usando um microscópio

eletrônico de varredura Quanta 200 da FEI, sob tensão de 10 a 15 KV, e analisadas as imagens quanto à integridade da mucosa intestinal levando em consideração perdas de epitélio e organização das vilosidades (SILVEIRA, 1998). Para determinar a densidade de vilos por área, nos diferentes períodos avaliados, foi realizada a contagem do número de vilos em três fotomicrografias eletrônicas de cada segmento, em aumento de 200 vezes, sendo que desta forma, a área total das fotomicrografias correspondeu à 4,80 mm². As fotomicrografias foram analisadas e expressas com número de vilos em 1 mm² de mucosa.

Ainda foi avaliada a integridade dos vilos de acordo com a perda de epitélio intestinal, adotando diferentes graus de escores (Figura 1), sendo eles: E1= sem perda de epitélio, E2= perda moderada, ou seja, com perda de epitélio desde o ápice do vilos até a metade do mesmo e E3= perda severa, com perda de epitélio na maior parte da extensão do vilos, adaptado de acordo com a metodologia de Gomide Jr. et al. (2004).

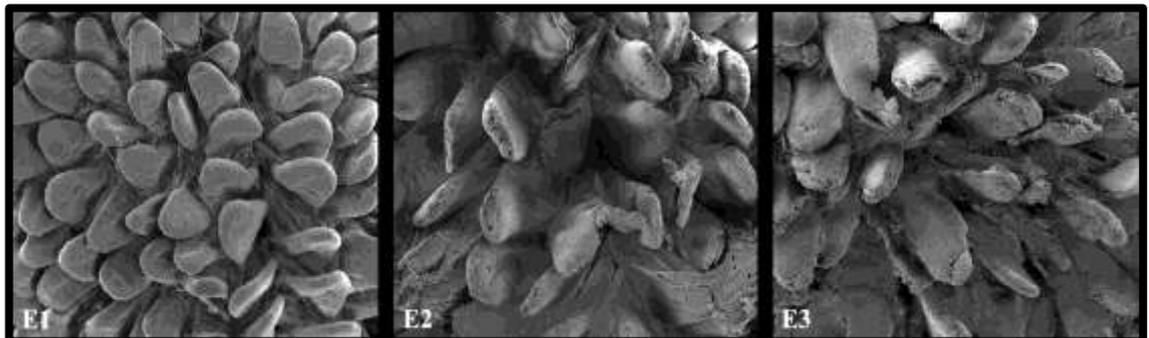


Figura 1: Fotomicrografia de escores de integridade da mucosa de acordo com a perda de epitélio do intestino delgado de frangos de corte. E1: sem perda de epitélio; E2: perda moderada, perda de epitélio desde o ápice do vilos até a metade do mesmo; E3: perda severa, com perda de epitélio na maior parte da extensão do vilos. Aumento de 200X.

Os dados da densidade de vilos (nº de vilos/área) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional Statistical Analysis System (2009), utilizando o procedimento *General Linear Models* (GLM). As médias entre os tratamentos, quando significativas, foram comparadas pelo teste de *Tukey* a 5% de

probabilidade. Já os dados da integridade de vilos de acordo com a perda epitelial, foram submetidos à análise de variância pelo mesmo programa, mas utilizando o procedimento *Proc Glimix*. As médias entre os tratamentos foram estimadas usando-se o LSMEANS e a comparação entre elas, quando necessária, realizada por meio da probabilidade da diferença (PDIFF), usando o teste de *Tukey* a 5%.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Nesta análise, foi sacrificado um total de 96 aves, em que foram coletadas amostras do segmento de duodeno de oito aves por tratamento, sendo assim por período foram sacrificadas 32 aves aos 7, 14 e 42 dias de idade, as quais foram fixadas em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, pH 7,3. As amostras foram seccionadas transversalmente, em segmentos de aproximadamente 1 mm, e mantidos em fixador, por pelo menos 12 horas. Os fragmentos de duodeno das aves foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, no escuro, lavados em água destilada, contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% e novamente lavados. Seguiu-se, então, a desidratação em série crescente de concentração de acetona e a infiltração por um período de 12 horas em solução 1:1 de mistura de acetona e resina epóxi. Após a infiltração, as amostras do segmento do duodeno foram pré-incluídos em mistura de resina epóxi, em frasco aberto, colocados em estufa a 37° C por 1 hora, seguindo-se a inclusão em nova mistura de araldite, em estufa a 58-60° C por 48 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Ultratome III do LKB, equipado com navalha de diamante, coletados em telas de cobre, e contrastados em acetato de uranila a partir de uma solução saturada preparada em etanol 50%, por 20 minutos, no escuro. Após lavagem por várias vezes em etanol 50%, as amostras sofreram nova contrastação em citrato de chumbo por 10

minutos, seguida de lavagem, por várias vezes, em água destilada. Os cortes assim preparados foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit-FEI com captura de imagem digital e analisadas as imagens da mucosa duodenal (MACHADO et al., 1998). Posteriormente após a captura das imagens, procedeu-se as mensurações da altura das microvilosidades, que foram registradas desde a base até o ápice do microvilo, a largura das microvilosidades, mensuradas de um lado ao outro dos microvilos, e, por fim, a mensuração do eixo transversal dos enterócitos que foi feito através da medida entre dois complexos juncionais (Figura 2).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional Statistical Analysis System (2009), utilizando o procedimento *General Linear Models* (GLM). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste *Tukey* a 5%.

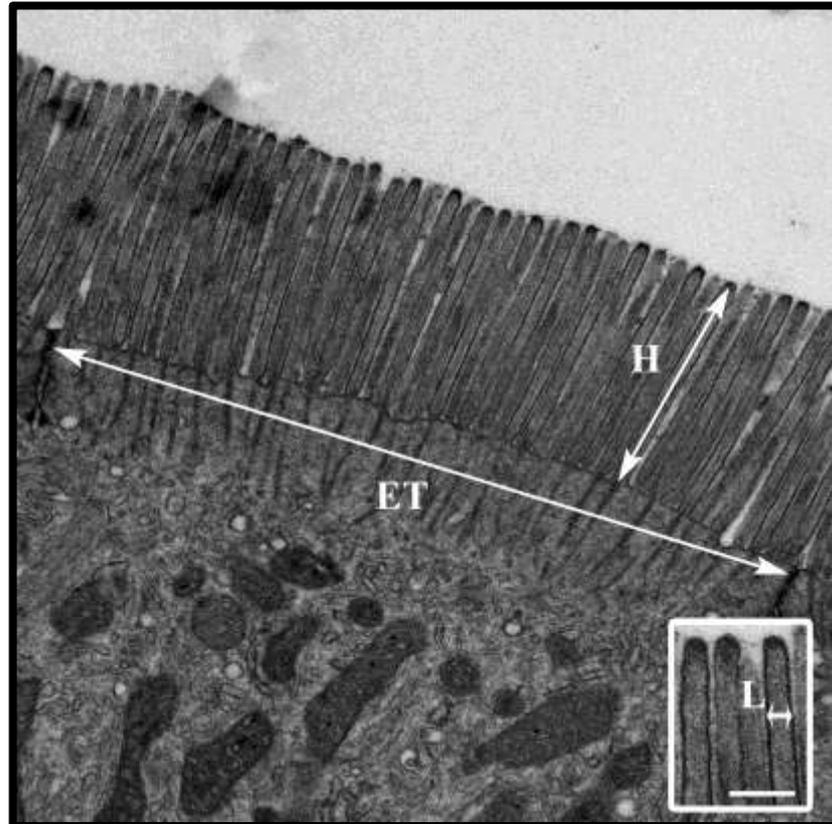


Figura 2. Fotomicrografia de transmissão do segmento de duodeno de frangos de corte aos 7 dias de idade, evidenciando: H: altura da microvilosidade; ET: eixo transversal dos complexos juncionais do enterócito; aumento: 6800X. In set: L: largura da microvilosidade; Aumento: 11300X.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopia Eletrônica de Varredura

Densidade e Integridade dos Vilos aos 7, 14 e 42 dias de idade

Aos 7 dias de idade, observou-se que os tratamentos influenciaram apenas o segmento do jejuno dos frangos de corte ($p < 0,05$); mostrando que a inclusão de aminoácidos sintéticos melhorou a relação vilo/área, quando comparado ao tratamento controle (Tabela 1). Com relação à integridade dos vilos aos 7 dias de idade, foi possível observar de maneira semelhante a confirmar os dados de densidade, que a melhor integridade dos vilos foi verificada para as aves que foram suplementadas com

os tratamentos 1% de ácido glutâmico e 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico, não diferindo do tratamento que continha 1% de glutamina (Figura 3).

Já para os demais segmentos do intestino delgado, o duodeno e íleo, a densidade dos vilos não foi influenciada pelos tratamentos ($p>0,05$), porém com relação à integridade intestinal, no segmento de duodeno, os resultados mostraram melhor integridade e comprimento para os vilos dos tratamentos com 1% de glutamina e com 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico, diferindo do tratamento controle e do tratamento com 1% de ácido glutâmico. No segmento de íleo, a integridade dos vilos não foi influenciada pelos tratamentos (Figura 3). Os resultados deste trabalho estão parcialmente concordantes com os observados por Maiorka (2002), que em estudo com matrizes de diferentes idades, níveis de energia e suplementando ou não com glutamina, não verificou alteração de densidade de vilos para nenhum dos segmentos intestinais, aos 7 dias de idade.

De acordo com Macari (1995), o tamanho dos microvilos e das vilosidades, bem como a densidade dos vilos em cada segmento do intestino delgado apresentam características próprias, e na presença de nutrientes a capacidade absorptiva é proporcional à densidade e ao tamanho das vilosidades, ou seja, à área disponível para absorção. Desta forma, a absorção será efetiva se os enterócitos apresentarem integridade funcional.

Tabela 1. Densidade de vilos (número de vilos/mm²) por segmento do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade

Tratamentos	Número de vilos /área		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
Controle	23,75	27,12A	69,21
L-Gln (1%)	26,04	35,13AB	67,25
L-Glu (1%)	24,50	42,96B	70,29
Gln/Glu (2%)	29,08	40,87B	68,33
Médias	25,84	37,31	68,77
Prob	0,151	0,003	0,959
CV(%)	14,36	14,85	13,38

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu=Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

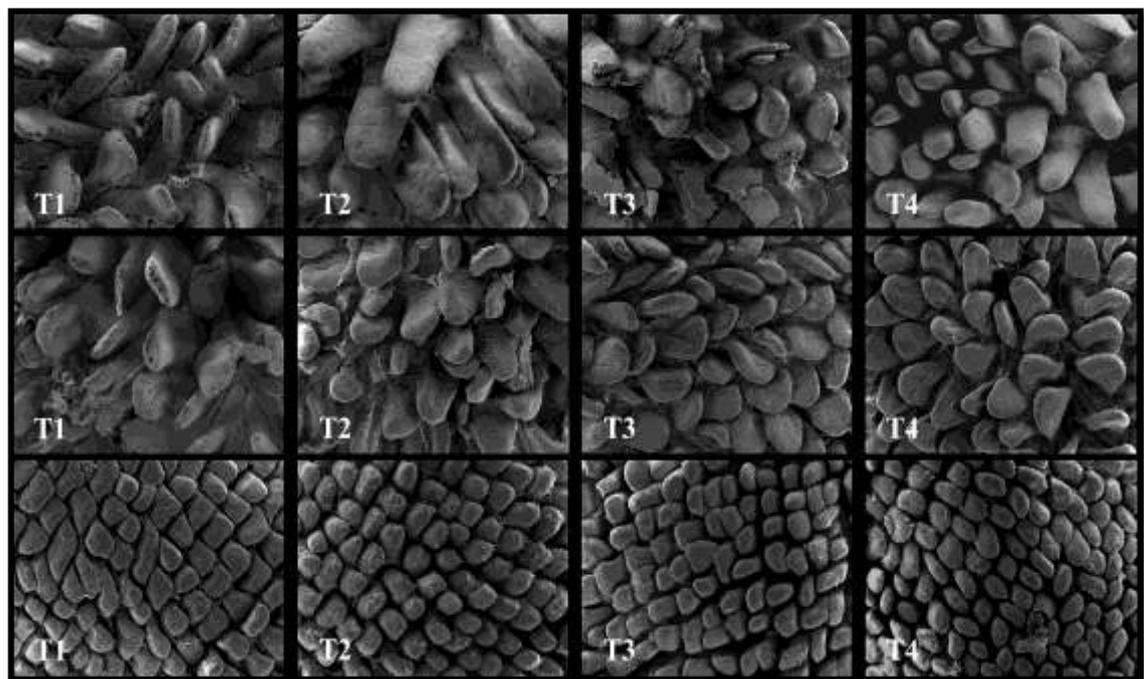


Figura 3: Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado de frangos de corte, aos 7 dias de idade. Em T1: Tratamento controle; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: Duodeno; na linha 2: jejuno; e na linha 3: Íleo. Aumento 200X.

Aos 14 dias de idade, os tratamentos não influenciaram a densidade dos vilos ($p > 0,05$) em nenhum dos segmentos que compõem o intestino delgado. Os resultados desta pesquisa diferem dos encontrados por Fisher da Silva (2001), que trabalhando

com frangos de corte submetidos a restrição alimentar e suplementados com 1% de glutamina, apresentaram diminuição no número de vilos com a restrição no segmento do íleo, entretanto com a adição de 1% de glutamina houve aumento no número de vilos do jejuno e íleo aos 14 dias de idade. Da mesma forma, Luquetti (2005) trabalhando com frangos de corte vacinados ou não e suplementando com glutamina, observou que este aminoácido adicionado à dieta, aumentou o número de vilos aos 14 dias de idade.

Em relação à preservação das vilosidades intestinais (Figura 4), no segmento do duodeno, o tratamento 4 que continha 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico apresentou melhor preservação dos vilos quando comparado com os demais tratamentos. O tamanho dos vilos neste segmento de intestino delgado foi semelhante em todos os tratamentos, pois de acordo com Uni et al. (1998a), no segmento do duodeno de frangos de corte, a altura dos vilos cresce desde o 17º dia de incubação até 7º dia pós eclosão das aves.

No próximo segmento do intestino delgado, o jejuno, na mesma idade, os tratamentos não influenciaram a integridade dos vilos. Já no último segmento do intestino delgado, o íleo, o tratamento que continha a combinação de glutamina e ácido glutâmico (2%), apresentou vilos mais íntegros, não diferindo do tratamento que continha 1% de ácido glutâmico (Figura 4).

A altura e a forma dos vilos não são necessariamente as mesmas ao longo de todo o intestino delgado (Figura 4). De acordo com Uni et al. (1998a) a altura dos vilos nos segmentos do jejuno e íleo aumentam até o 14º dia de vida das aves. A forma das vilosidades no duodeno apresentava-se mais esparsas, longas, em menor número e em forma de folha. O jejuno e o íleo apresentavam maior densidade de vilos, sendo estes

em formato de ziguezague e tendo a forma de língua respectivamente. Estas observações corroboram com outros trabalhos da literatura como os descritos por Yamauchi & Isshiki (1991), Loddi (2003) e Pelicano et al. (2003).

Segundo Yamauchi & Isshiki (1991), a forma de organização entre os vilos em ziguezague, pode possibilitar uma estrutura mais eficiente na absorção de nutrientes se comparado aos vilos em uma organização aleatória, pois o caminho percorrido pelo bolo alimentar seria maior no fluxo em ziguezague, possibilitando assim, um maior contato entre os nutrientes e a superfície de absorção do epitélio intestinal.

Tabela 2. Densidade de vilos (número de vilos/mm²) por segmento do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade

Tratamentos	Número de vilos /área		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
Controle	17,33	22,62	50,78
L-Gln (1%)	14,71	23,62	44,96
L-Glu (1%)	16,96	19,79	43,04
Gln/Glu (2%)	15,46	19,50	51,46
Médias	16,11	21,38	45,54
Prob	0,350	0,447	0,586
CV(%)	15,86	22,21	24,09

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu=Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

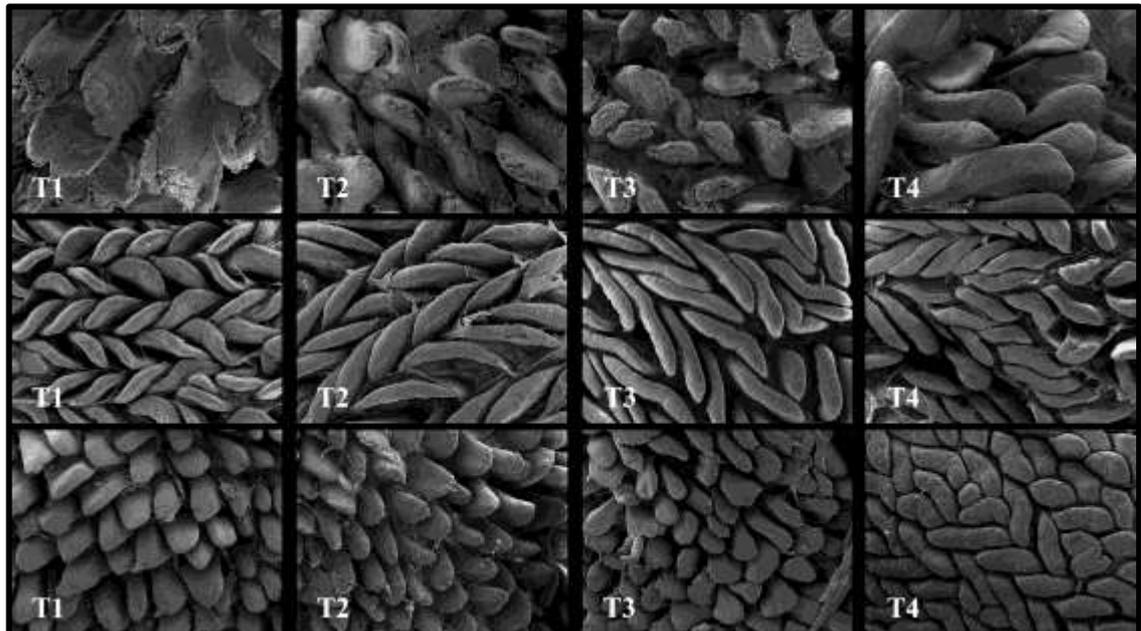


Figura 4: Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado de frangos de corte, aos 14 dias de idade. Em T1: Tratamento controle; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: Duodeno; na linha 2: Jejunio; e na linha 3: Íleo. Aumento 200X.

Aos 42 dias de idade, a densidade dos vilos das aves suplementadas com glutamina, ácido glutâmico e a combinação de glutamina e ácido glutâmico não foram influenciadas ($p > 0,05$), conforme a Tabela 3. De forma semelhante, em trabalho com a administração de probióticos na água de bebida, proporcionou menores densidades de vilos em todos os segmentos de intestino delgado de frangos de corte aos 42 dias de idade (PELICANO et al., 2003).

A integridade das vilosidades no segmento de duodeno aos 42 dias de idade, não foi influenciado pelos tratamentos. No segmento de jejuno, o tratamento com 1% de glutamina apresentou vilos mais íntegros em comparação aos demais tratamentos. Já para o segmento do íleo, nos tratamentos controle, com glutamina (1%) e com ácido glutâmico (1%) apresentaram vilos mais íntegros em relação à combinação de glutamina e ácido glutâmico (2%), embora não diferenciaram entre si (Figura 5).

Yamauchi & Isshiki (1991) observaram que o número de vilos decresce com a idade e cresce no sentido craniocaudal, ou seja, do duodeno para o íleo. Os autores verificaram ainda que o número de vilos é reduzido quando as aves atingem 10 dias de idade, independente da linhagem.

Tabela 3. Densidade de vilos (número de vilos/mm²) por segmento do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade

Tratamentos	Número de vilos /área		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
Controle	11,63	13,78	19,96
L-Gln (1%)	11,33	13,33	22,00
L-Glu (1%)	10,42	14,75	18,25
Gln/Glu (2%)	13,54	14,67	22,33
Médias	12,92	14,13	20,63
Prob	0,416	0,673	0,06
CV(%)	19,91	16,43	12,82

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu=Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

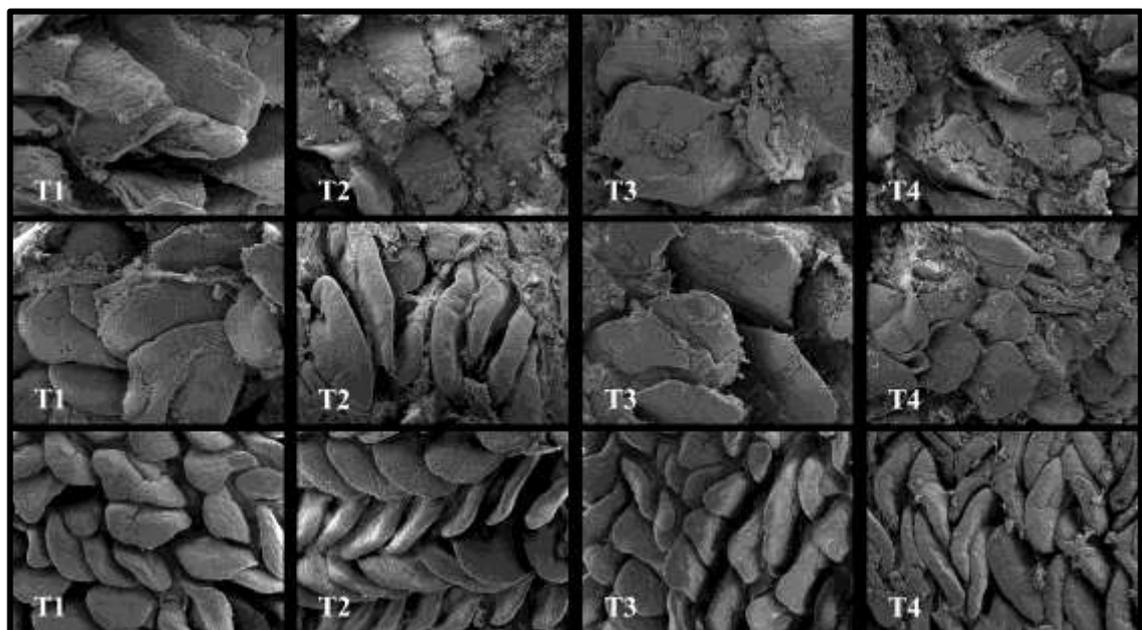


Figura. 5: Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado de frangos de corte, aos 42 dias de idade. Em T1: Tratamento controle; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Na linha 1: Duodeno; Na linha 2: Jejuno; e na linha 3: Íleo. Aumento 200X.

Avaliação de perda epitelial da mucosa intestinal aos 7, 14 e 42 dias de idade

Aos 7 dias de idade, para o segmento de duodeno, foi possível observar que a porcentagem de perda epitelial dos vilos no grau 1 não apresentou diferença entre os tratamentos. Para o grau 2, as aves do grupo controle, e que receberam a suplementação com 1% de glutamina (L-Gln) e 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico (Gln/Glu) apresentaram maior porcentagem de vilos, ou seja, vilos com lesão moderada. Já para o grau 3, as aves suplementadas com o tratamento que continha 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico foi o que mostrou ter menor número de vilos com lesão severa, embora não ter diferenciado do tratamento em que as aves foram suplementadas com 1% de glutamina (Figura 6). No segmento de jejuno, foi constatado melhor integridade de vilos na mucosa das aves suplementadas com 2% de da combinação de glutamina e ácido glutâmico, portanto maior porcentagem de vilos no grau 1. O grau 2 não apresentou influência dos tratamentos, enquanto que no grau 3, a menor perda de epitélio foi evidenciada nas aves que receberam a suplementação com 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico, não diferenciando do tratamento com 1% de glutamina (Figura 7).

Nas primeiras semanas de vida da ave, a capacidade do trato gastrointestinal é relativamente baixa, assim substâncias que tenham ação trófica sobre a mucosa intestinal poderão propiciar melhor desempenho, através da capacidade de digerir e absorver os nutrientes advindos da dieta. Assim a suplementação com glutamina, parece ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento da mucosa, preservando a integridade dos vilos na eclosão (MAIORKA et al., 2000). Já para o segmento de íleo, o melhor resultado foi observado para as aves que foram suplementadas com tratamento

que continha 1% de ácido glutâmico (L-Glu), para o grau 1 e 3, não diferenciando dos tratamentos controle e com suplementação de 1% de glutamina (Figura 8).

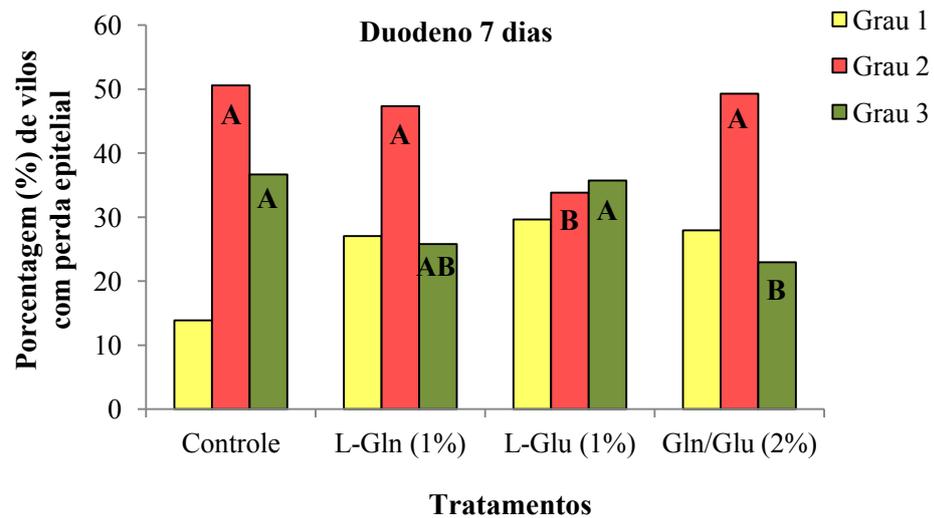


Figura 6. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 7 dias de idade.

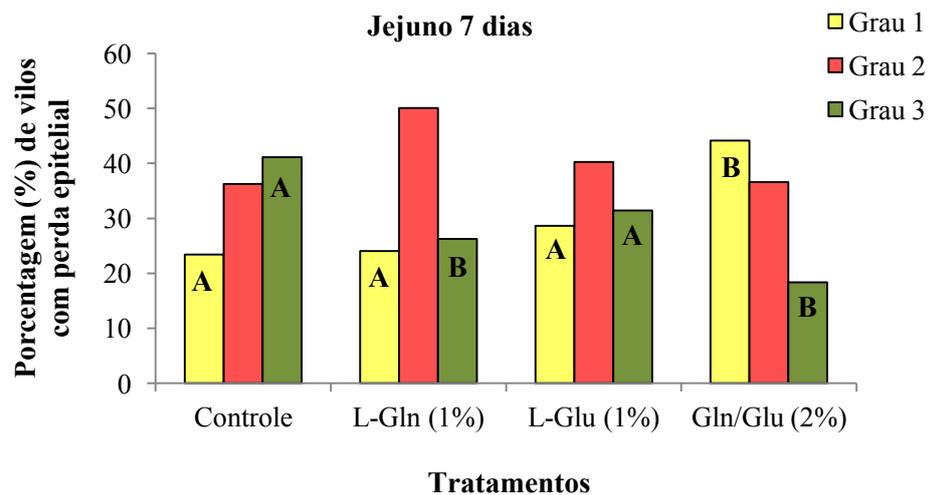


Figura 7. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 7 dias de idade.

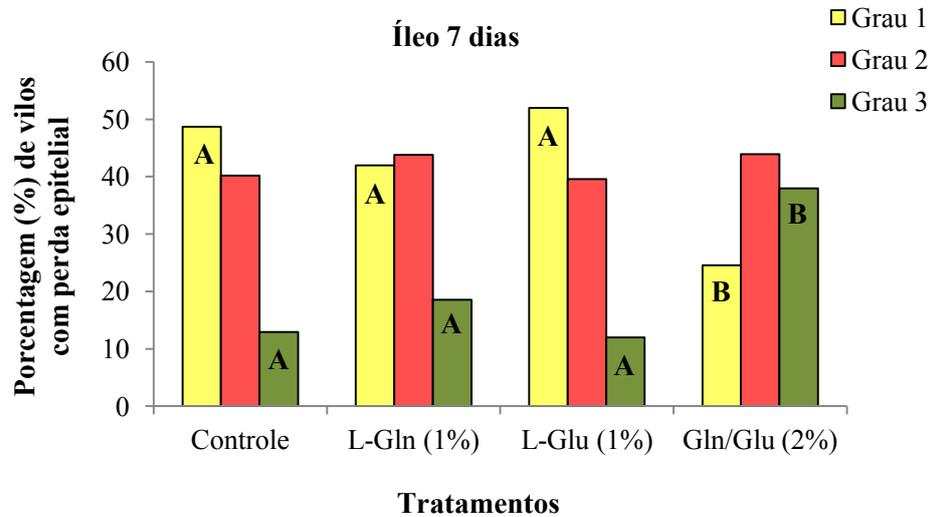


Figura 8. Avaliação da perda epitelia dos vilos da mucosa do íleo de frangos de corte aos 7 dias de idade.

No período de 14 dias de idade, no segmento de duodeno, não foi possível verificar diferença entre os graus para os tratamentos (Figura 9). No jejuno, as aves suplementadas com 1% de glutamina na dieta (L-Gln), apresentaram melhor integridade dos vilos para o grau 1, tendo pouca perda de epitélio, não sendo diferente do tratamento com 1% de ácido glutâmico (Figura 10). Enquanto que as aves suplementadas com o tratamento que continha 1% de ácido glutâmico (L-Glu) e 1% de glutamina também mostraram menor perda severa dos vilos (Grau 3). De maneira semelhante foi observado maior número de vilos íntegros ou com severidade moderada em aves que não receberam a vacina de coccidiose e foram suplementadas ou não com 1% de glutamina (Luquetti, 2005).

No íleo, as aves que receberam a dieta controle apresentaram menor número de vilos íntegros, sendo diferente dos demais tratamentos (Grau 1). Para o grau 2, o tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico (Gln/Glu) foi o que apresentou menor perda moderada do epitélio intestinal, enquanto que as aves que receberam ração controle, com suplementação de 1% de glutamina e

ácido glutâmico foram considerados melhores para o grau 3, com baixa perda de epitélio (Figura 11).

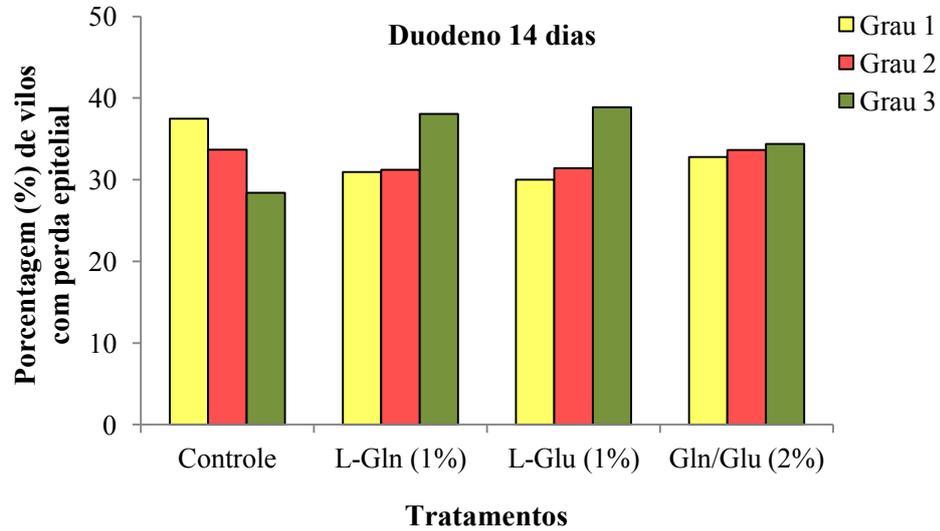


Figura 9. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 14 dias de idade.

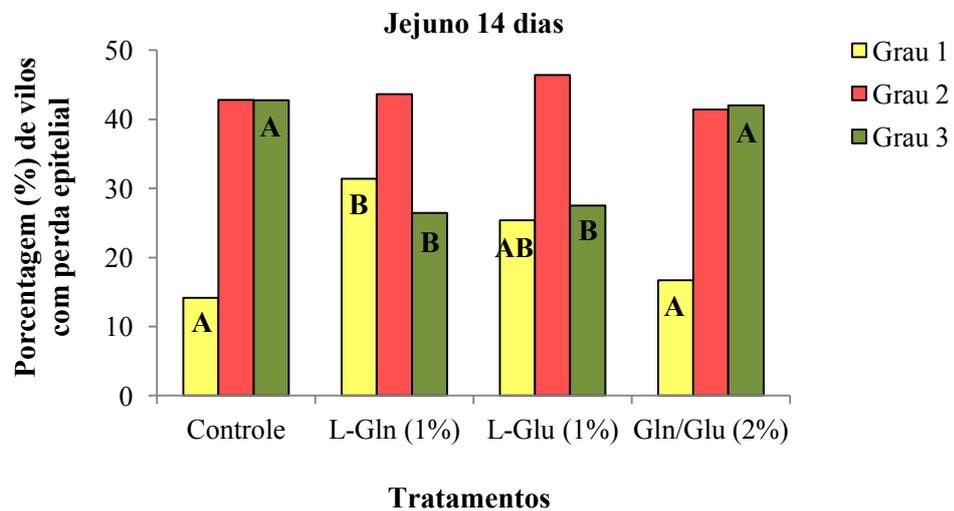


Figura 10. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 14 dias de idade.

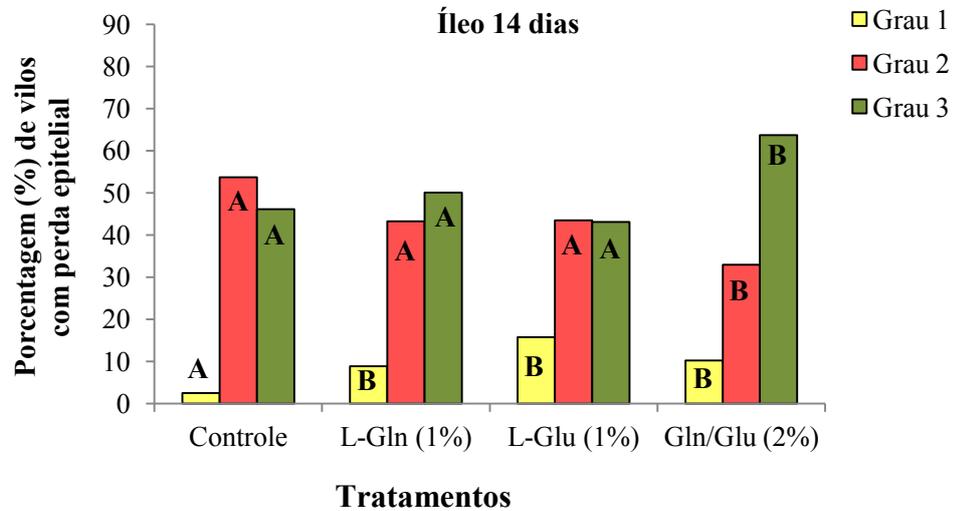


Figura 11. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do íleo de frangos de corte aos 14 dias de idade.

No período total de criação aos 42 dias de idade, no segmento de duodeno, houve a predominância de vilos com maior perda de epitélio no grau 3, apresentando alta severidade (Figura 12). Já para o segmento do intestino delgado, o jejuno, tal como no segmento anterior houve predominância de vilos com perda de integridade, sendo evidenciado melhores resultados para as aves suplementadas com o tratamento de 1% de ácido glutâmico (Figura 13). Por último, o segmento de íleo, as aves pertencentes ao grupo controle foi considerado melhor nesta idade com baixa e moderada perda epitelial, respectivamente grau 1 e 2. Para o grau 3, com alta severidade de perda de epitélio dos vilos, o que mostrou melhor resultado foram os vilos das aves suplementadas com os tratamentos controle e com suplementação de 1% de glutamina (L-Gln), em relação aos demais tratamentos (Figura 14). De maneira similar, Luquetti (2005), verificou maior porcentagem de vilos com maiores graus de severidade de perda de epitélio nos períodos finais de criação.

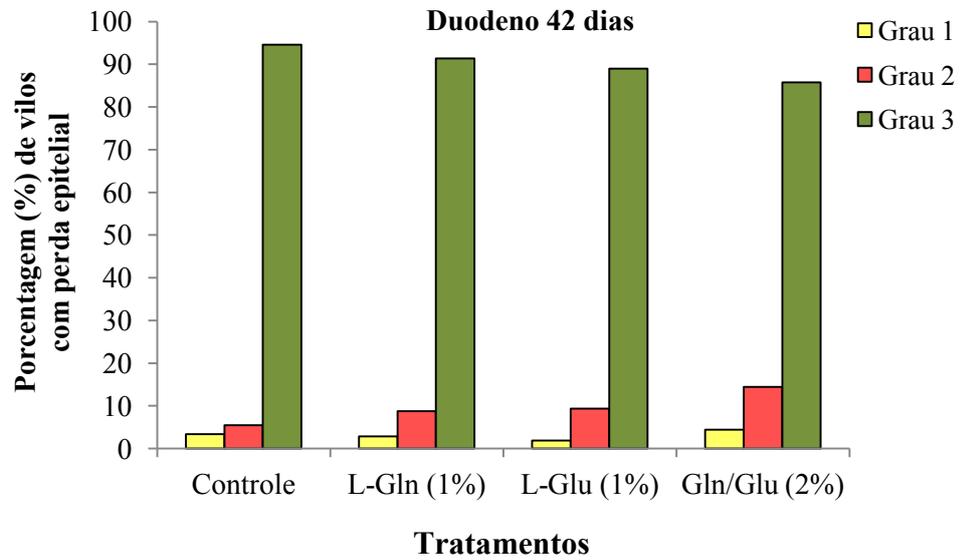


Figura 12. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 42 dias de idade.

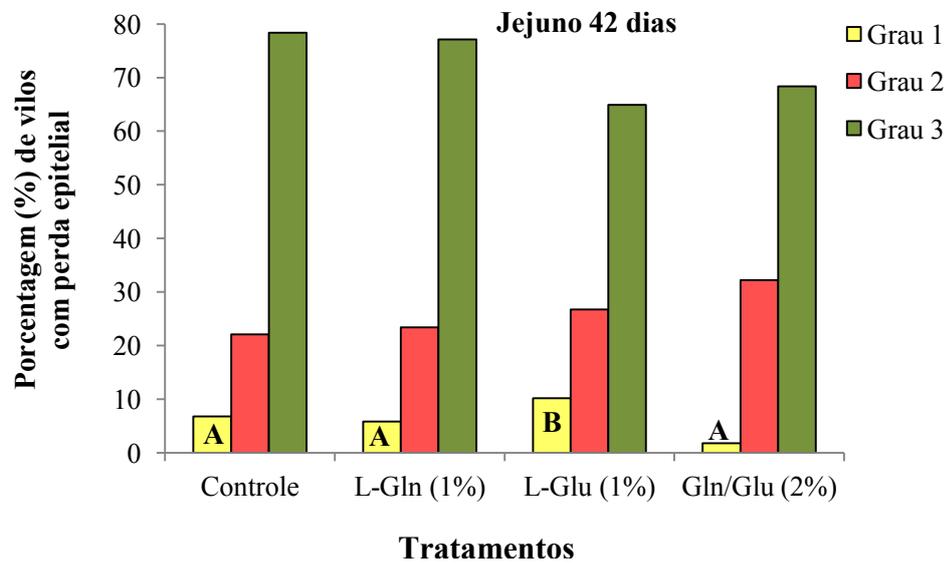


Figura 13. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade.

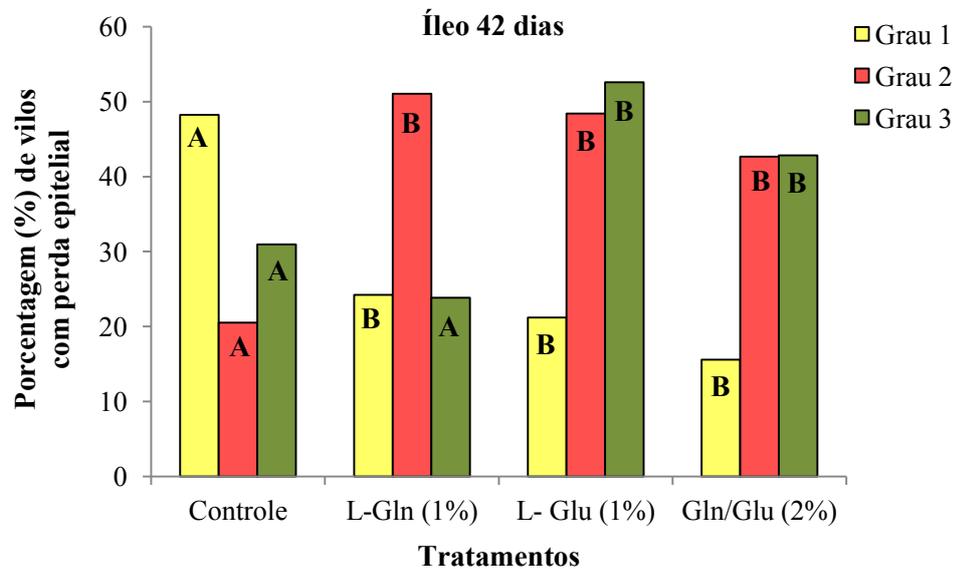


Figura 14. Avaliação da perda epitelial dos vilos da mucosa do íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Microscopia Eletrônica de transmissão do segmento de duodeno

Aos 7, 14 e 42 dias de idade, as variáveis de eixo transversal dos enterócitos, altura e largura das microvilosidades não foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 4 e Figuras 15, 16 e 17). Os resultados do presente estudo são contraditórios aos encontrados por Fisher da Silva (2001), que ao desenvolver um experimento com frangos de corte, em que sofreram restrição alimentar (30%) e suplementados ou não com glutamina, encontraram diferenças para a altura dos microvilos no duodeno e jejuno aos 14 dias de idade. Enquanto que para a largura dos microvilos, semelhante à presente pesquisa, na mesma idade, a mesma pesquisadora Fisher da Silva (2001) não encontrou diferenças entre os tratamentos para esta variável.

Outros autores (OVERTON & SHOUP, 1964) e (CHAMBERS & GREY, 1979) citados por Ferrer et al. (1995) estudaram, respectivamente, a estrutura e maturação das células absortivas e o desenvolvimento das células epiteliais na superfície das vilosidades em galinhas. Em seu estudo Overton e Shoup (1964) observaram que

mudanças no comprimento dos microvilos não são acompanhadas por qualquer mudança no diâmetro dos microvilos. Entretanto, Chambers e Grey (1979) trabalhando com galinhas, desde a fase embrionária, verificaram pequenas variações na largura dos microvilos e significativa mudança ou redução no diâmetro do microvilos. Entretanto estes mesmos autores, verificaram ainda haver pequenas variações na largura dos microvilos do duodeno durante a 1ª e 6ª semana de vida das aves. Frente a isso, Ferrer et al. (1995) concluíram que a altura e a densidade dos microvilos são as variáveis que melhor explicam as mudanças que podem ocorrer na área superficial das células absortivas.

Tabela 4. Medida do eixo transversal dos enterócitos, altura e largura das microvilosidades do segmento de duodeno de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7, 14 e 42 dias de idade

Duodeno			
7 dias			
Tratamentos	Variáveis (μm)		
	Eixo Transversal dos enterócitos	Altura microvilosidades	Largura microvilosidades
Controle	4,15	1,57	0,12
L-Gln (1%)	4,55	1,54	0,11
L-Glu (1%)	5,80	1,41	0,12
Gln/Glu (2%)	4,89	2,04	0,11
Médias	4,85	1,65	0,12
Prob	0,402	0,278	0,538
CV(%)	23,93	23,58	9,38
14 dias			
Controle	5,12	1,89	0,13
L-Gln (1%)	4,64	2,41	0,12
L-Glu (1%)	4,85	1,87	0,13
Gln/Glu (2%)	5,20	1,85	0,12
Médias	4,95	2,00	0,12
Prob	0,58	0,38	0,56
CV(%)	10,79	22,05	5,06
42 dias			
Controle	4,77	1,97	0,10
L-Gln (1%)	4,43	1,57	0,09
L-Glu (1%)	5,17	1,92	0,11
Gln/Glu (2%)	4,49	2,23	0,09
Médias	4,71	1,94	0,10
Prob	0,75	0,32	0,33
CV(%)	19,60	22,60	14,72

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu=Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação.

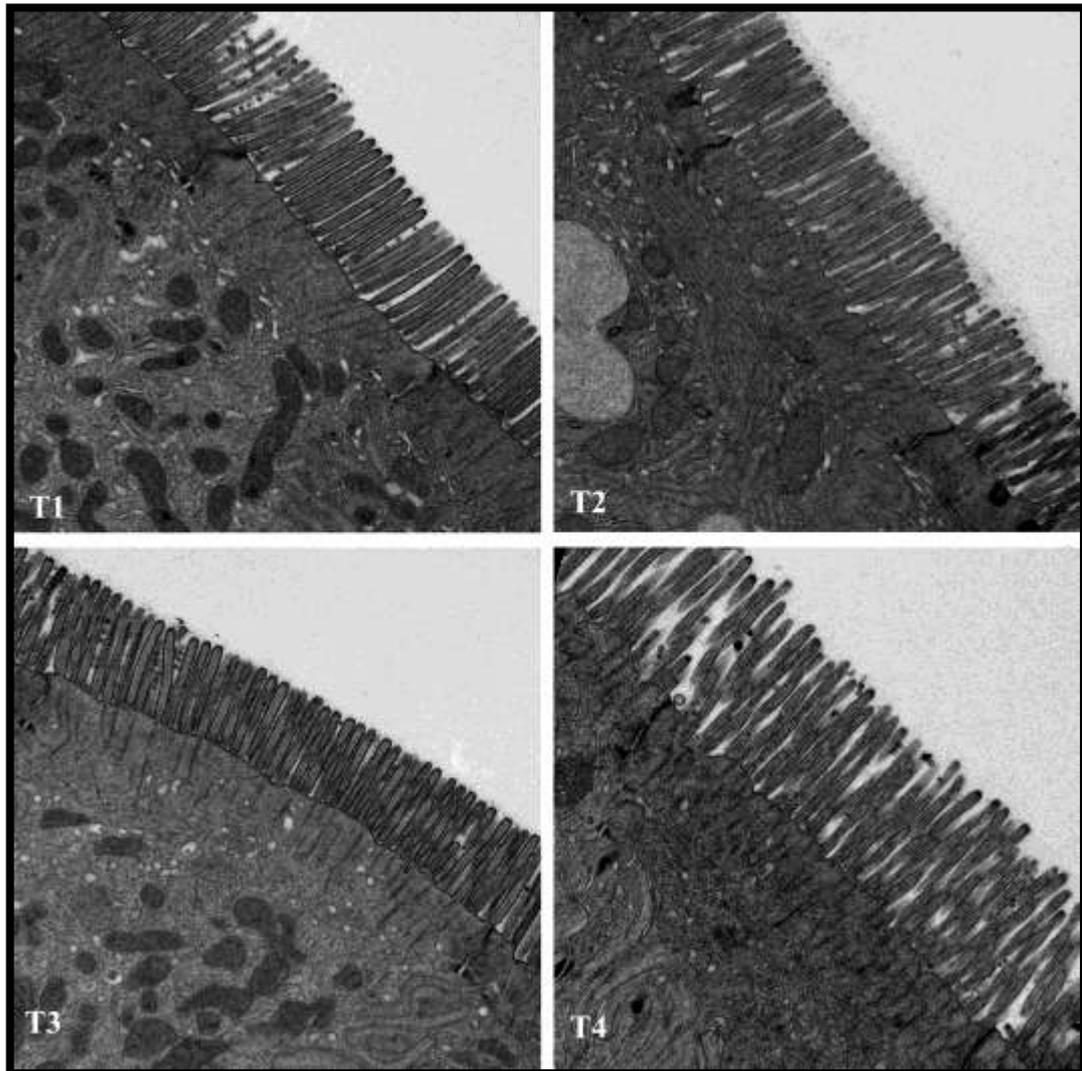


Figura 15: Fotomicrografia da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 7 dias de idade. Em T1: Tratamento controle sem adição de aditivo; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aumento 6800x.

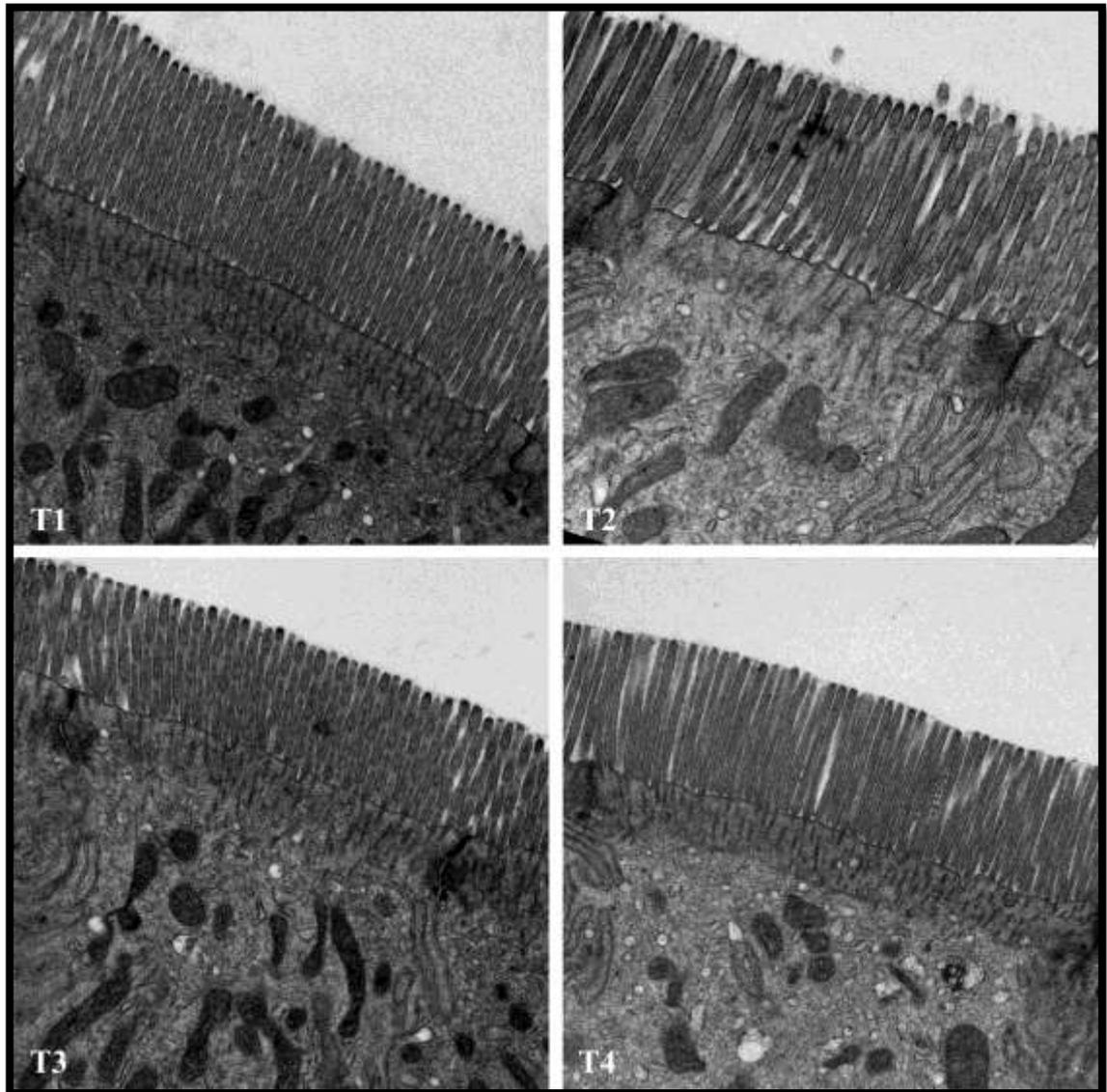


Figura 16: Fotomicrografia da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 14 dias de idade. Em T1: Tratamento controle sem adição de aditivo; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aumento 6800x.

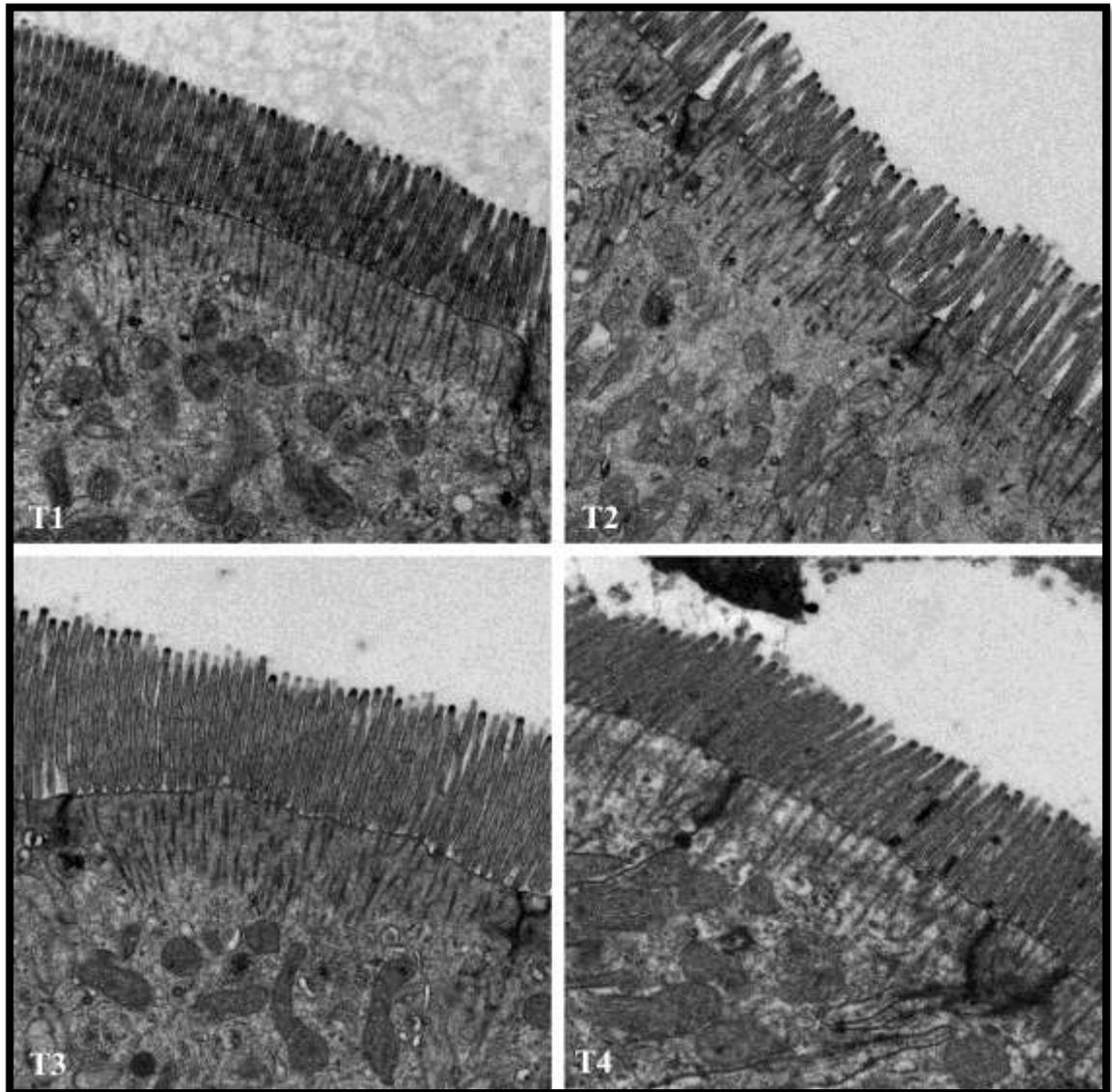


Figura 17: Fotomicrografia da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 42 dias de idade. Em T1: Tratamento controle sem adição de aditivo; T2: Tratamento com suplementação de 1% de glutamina; T3: Tratamento com suplementação de 1% de ácido glutâmico e T4: tratamento com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aumento 6800x.

CONCLUSÃO

A suplementação com aminoácidos sintéticos na dieta para frangos de corte aumentaram a densidade de vilos aos 7 dias de idade, enquanto que a suplementação de 1% de glutamina na dieta proporcionou melhora da integridade das vilosidades nas fases iniciais. Os tratamentos não influenciaram as variáveis de dimensão das células absortivas do epitélio intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAMBERS, C.; GREY, R.D. Development of the structure components of the brush border in absorptive cells of the chicks intestine. **Cell Tissue Research**, v.204, p.387-409, 1979.
- FERRER, R.; PLANAS, J.M.; MORETO, M. Cell apical surface area in enterocytes from chicken small and large intestine during development. **Poultry Science**, v.74, p.1995-2002, 1995.
- FISCHER DA SILVA, A.V. **Efeitos da restrição alimentar precoce e da glutamina no desempenho e na mucosa intestinal de frangos**. 2001.77f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- GOMIDE-Jr, M. L.; STERZO, E. V.; MACARI, M.; BOLELI, I. C. Use of scanning electron microscopy for the evaluation of intestinal epithelium integrity. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1500-1505, 2004.
- LOODI, M.M. **Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico em dietas para frangos de corte**. 2003. 52f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- LUQUETTI, B.C. **Efeito da vacinação contra coccidiose aviária e da suplementação de glutamina ou prebiótico sobre a mucosa intestinal em frangos**. 2005. 106f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- MACARI, M. Mecanismos de proliferação e reparação da mucosa gastrintestinal em aves. SIMPÓSIO DE COCCIDIOSE E ENTERITE, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: [s.n.], 1995p.
- MACHADO, R.D.; SOUZA, W. ; HADDAD, A. Desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contrastação, e obtenção e coloração de cortes semifinos. In: SOUZA, W. **Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicada as Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro, p.22- 32, 1998.
- MAIORKA, A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento e Reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, p.113-123, 2002.
- MAIORKA, A. **Efeitos da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte**. 2002. 103f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

- MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; SANTIN, E.; BORGES, A.S.; BOLELI, I.C.; MACARI M. Influência da suplementação de Glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.487-490. 2000.
- MORAN Jr, E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through prenatal development. **Journal of Nutrition**, p.115: 665, 1985.
- OVERTON, J.; SHOUP, J. Fine structure of cell surface specialization in the maturing duodenal mucosa of the chickens. **Journal of the Cell Biology**. v.21, p.75-85.1964
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, n.547, p.125-134, 2003.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's Guide**: Version 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.
- SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para a Microscopia Eletrônica de Varredura. In: SOUZA , W. **Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicada as Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro, p.33- 56, 1998.
- UNI, Z.; PLATIN, R.; SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. **Comparative Physiology B.**, 168: 241-247, 1998b.
- UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v.77, p.75-82,1998a.
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. **British Poultry Science**, v.36, p. 63-71, 1996.
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy-and light-strain chicks. **Poultry Science**. v.74, p.1622-1629, 1995.
- YAMAUCHI, K.E.; ISSHIKI, Y. Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing white leghorn and broiler chickens from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**, v.32, p.67-78, 1991.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA MUCOSA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA
MUCOSA ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM
GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO**

RESUMO - Com objetivo de avaliar a proliferação celular, por meio da utilização de imunohistoquímica (PCNA) em frangos de corte suplementados com aminoácidos sintéticos na ração, foram alojados 340 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®], com densidade populacional de 12 aves/m², por 42 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições de 17 aves cada. Os tratamentos foram: 1- Ração basal; 2- Ração basal com suplementação de 1% de glutamina; 3- Ração basal com suplementação de 1% de ácido glutâmico; 4- Ração basal com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Foram sacrificadas 60 aves, sendo que em cada período avaliado aos 7, 14 e 42 dias de idade apenas 20 aves foram eutanasiadas por vez, em que foi realizada a coleta de segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de cinco aves por tratamento, e fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas. Seguindo a rotina histológica, os cortes foram obtidos para posterior análise de imunohistoquímica. Em seguida foi efetuada a contagem das células com núcleos positivos. Os tratamentos não influenciaram o número de células presentes nas criptas, nem nos ápices das vilosidades dos diferentes segmentos do intestino delgado, para todos os períodos avaliados. Foi possível verificar maior quantidade de células proliferativas nas criptas.

Palavras-chave: anticorpo, aves, aminoácidos, imunohistoquímica, intestino, vilosidades.

**EVALUATION OF EXPRESSION CELLULAR PROLIFERATION MUCOSA
ENTERIC OF BROILERS SUPPLEMENTED WITH GLUTAMINE AND
GLUTAMIC ACID**

ABSTRACT- In order to evaluate cellular proliferation, through the use of immunohistochemical (PCNA) in broilers supplemented with synthetic amino acids in the ration, 340 chicks one day old, male, Cobb[®], with a density population of 12 birds/m², for 42 days were allocated. The design was completely randomized with four treatments and five replicates of 17 birds each. The treatments were: 1 - basal ration; 2 - basal ration supplemented with 1% glutamine; 3 - basal ration supplemented with 1% glutamic acid; 4 - basal ration supplemented with 2% of the combination of glutamine and glutamic acid. Were sacrificed 60 birds, and that in each period valued at 7, 14 and 42 days of age only 20 birds were euthanized, it was carried out collection of segments of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) of five birds per treatment, and fixed in 10% formalin for 24 hours. Following the histological examination, the sections were obtained for analysis of immunohistochemical. Was then performed with cell counting positives nuclei. The treatments did not affect the number of cells present in the crypts and villi apices of different segments of the small intestine, in all periods valued. It was possible to verify more amount of proliferating cells in the crypts.

Keywords: antibody, birds, amino acids, immunohistochemical, intestine, villis.

INTRODUÇÃO

A renovação do epitélio intestinal é um processo contínuo e dinâmico. A alta atividade mitótica é observada na região de transição cripta-vilo, cujas células são impelidas para o topo do vilo, onde se perdem nas chamadas zonas de extrusão, descamando para a luz do intestino. Dessa forma, a população celular do epitélio é mantida em equilíbrio dinâmico, no qual as células geradas nas criptas são equivalentes ao número de células perdidas na zona de descamação (CUNNINGHAN, 1992).

O equilíbrio dinâmico gerado entre os processos de renovação celular (proliferação e diferenciação) e perda de células (extrusão) determinam um *turnover* constante, ou seja, a manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, a manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal (MAIORKA et al., 2002). O processo de crescimento celular é desencadeado pela perda celular que ocorre na superfície das vilosidades, por processos de descamação. A proliferação celular dos enterócitos ocorre por divisões mitóticas nas criptas (CREAMER et al., 1961) e nos vilos (UNI et al., 2000), com constante migração destas células para a superfície das vilosidades, mantendo assim o processo de renovação celular da mucosa intestinal. A diferenciação e especialização de tais células ocorrem durante o processo migratório cripta-vilo (MACARI, 1995).

Neste processo de renovação e perda celular, o tempo do *turnover* ocorrer se torna importante, pois este é o tempo necessário para que uma célula originada no processo mitótico entre cripta-vilo migre para a extremidade do vilo e descame para o lúmen intestinal. Em aves este tempo oscila entre 90 a 96 horas, aproximadamente 4 dias, com uma velocidade de migração dos enterócitos para o ápice da vilosidade, ocorrendo a uma taxa de 4,0µm/hora (SMITH & PEACOCK, 1989). Considerando o tempo de

criação de frangos de corte, o tempo de este turnover ocorrer, representa 10% do ciclo de vida das aves (MACARI et al., 1994).

A mucosa do trato gastrointestinal pode ser afetada por agentes tróficos, relacionados com a ingestão e absorção dos alimentos. Segundo Sell et al. (1991) há grande perda celular na mucosa e conseqüente, renovação celular após a ingestão de ração, ou seja, a ingestão de alimento é considerado um fator estimulante para o crescimento dos vilos e criptas. Neste sentido, devido a capacidade funcional do trato gastrointestinal nas primeiras semanas de vida das aves ser considerado um fator limitante para o consumo de ração, agentes tróficos adicionados à dietas poderão propiciar melhor desempenho por aumentar a capacidade de absorção e digestão (MAIORKA et al., 2000). Assim a glutamina, um aminoácido neutro vem sendo pesquisado, pois seu efeito sobre a reconstituição da mucosa intestinal após alguma injúria tem despertado atenção, devido ao fato deste aminoácido ser o principal metabólito que nutre os enterócitos.

Acredita-se que o glutamato ou ácido glutâmico (Glu) e a glutamina (Gln) tenham uma via metabólica comum no enterócito. Wu et al. (1995) relataram que, no intestino delgado, a glutamina é metabolizada principalmente via hidrólise da Gln em Glu mais amônia pela glutaminase e a degradação subseqüente do glutamato via transaminação.

Desta forma, o objetivo da condução do presente estudo foi avaliar a proliferação celular através de marcadores mitóticos por meio de imunohistoquímica, utilizando a técnica de PCNA - Antígeno de Proliferação Celular nos diferentes períodos, suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação da glutamina e ácido glutâmico na dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental, as aves, as dietas e o manejo utilizados no experimento foram descritos no Capítulo 2 “Material e Métodos”, utilizado no Experimento II em que foi realizado as análises de morfometria intestinal.

Aos 7, 14 e 42 dias de idade, foi sacrificado um total de 60 aves, sendo que em cada período avaliado 20 aves foram sacrificadas e posteriormente efetuada a retirada do trato gastrointestinal para a coleta dos segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), que foram utilizados para as análises de imunohistoquímica PCNA, por meio de marcadores mitóticos que expressam a proliferação celular de frangos de corte.

Para a análise de imunohistoquímica com a detecção de PCNA (Clone PC10) foram coletadas amostras dos segmentos de duodeno, jejuno, íleo de cinco aves por tratamento nos diferentes períodos aos 7, 14 e 42 dias de idade. Após os cortes serem fixados nas lâminas histológicas, estas foram mantidas em estufa a 60°C por 24 horas, para a desparafinização.

Em seguida foram mergulhadas numa sequência de banhos em xilol (3 vezes) e em alcoóis (3 vezes), álcool 100%, álcool 90% e álcool 70%, e em água destilada. Logo após foi realizada a recuperação antigênica, que consiste em mergulhar as lâminas em solução Tampão Citrato 10mM, pH 6,0 em câmara de pressão (*Pascal Pressur Chamber*, Dako, EUA) de acordo com o programa indicado pelo fabricante. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente e em seguida foram lavadas com solução (PBS) tampão-fosfato (3 lavagens de 5 minutos). Posteriormente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena, colocando sobre o corte o bloqueador de peroxidase (*Kit EASYLINK Duo*), e mantidas no escuro por 10 minutos, e em seguida procedeu-se a lavagem em tampão-fosfato (3 vezes por 5 minutos). Logo

após procedeu-se o bloqueio de proteína (soro de cabra 10% com conservante - *Kit EASYLINK Duo*) por mais 10 minutos em temperatura ambiente sem a lavagem com PBS (solução tampão-fosfato).

Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários diluídos em solução de Albumina Sérica (ABS) a 1%, no qual se utilizou 150 µl do anticorpo por lâmina para realização da imunohistoquímica (Dako, EUA) que permaneceu por 60 minutos. Após a incubação dos anticorpos primários, foram lavadas novamente com solução de PBS. Na sequência, foi utilizado um amplificador que potencializa a ligação das enzimas conjugadas, que permaneceu por 15 minutos, em seguida lavagem com PBS. Em seguida, foi usado o polímero – HRP Universal (*Kit EASYLINK Duo*) que proporcionou uma melhor penetração na estrutura do tecido, por 30 minutos e novamente efetuou a lavagem com PBS.

Para a revelação da reação foi realizada com o cromógeno 3'3 diaminobenzidina – *Liquid (DAB)*, sendo utilizado 80 µl de cromógeno DAB, para 1ml do substrato DAB (*Kit EASYLINK Duo*) em temperatura ambiente e posterior lavagem com solução de PBS. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente. Em seguida foram desidratadas com alcoóis 70%, 95% e 100% (3 vezes), e por passagem em xilol (3 vezes). A montagem das lâminas foi realizada utilizando *Permount* e lamínulas (ESPOSITO et al., 2000). As lâminas foram avaliadas quanto a expressão de proliferação celular dos enterócitos e realizada a documentação fotográfica. Para a análise das células na imunohistoquímica, foram contadas aquelas que apresentavam núcleo positivo e que tinham a cor acastanhada. A análise quantitativa das células de PCNA foi realizada na região das criptas e no ápice do vilos da mucosa dos diferentes segmentos do intestino delgado, por meio da utilização de uma objetiva

graduada com área de 100m² acoplada ao microscópio (*Olympus CX21*) e com auxílio de um contador manual (Figura 1).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo *Software MINITAB*[®] 16 *Statistical Software* (2010). As médias foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%.

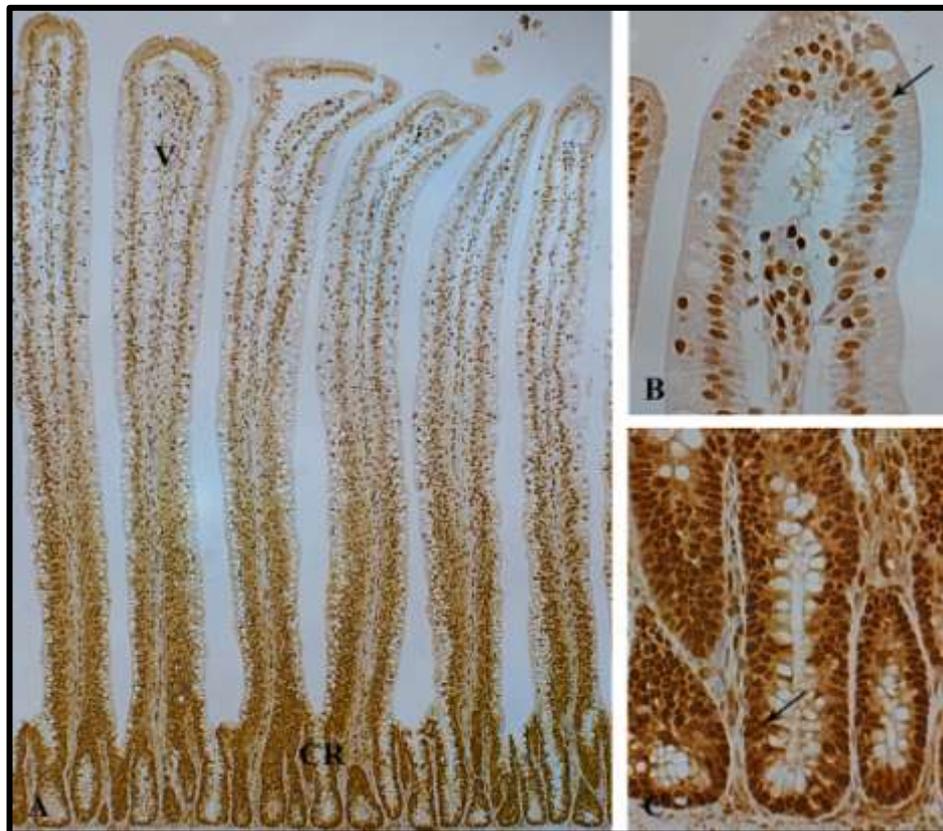


Figura1. Fotomicrografia do índice mitótico da mucosa duodenal de frangos de corte aos 7 dias de idade, no qual A) Mucosa duodenal (10X), V: Vilosidade, CR: Cripta. B) Ápice da vilosidade: seta: núcleo do enterócito marcada em marrom PCNA- positiva (20X), C: Cripta da mucosa do segmento duodenal (20X).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 7 dias de idade, os tratamentos não influenciaram o número de células PCNA-positivas do ápice e das criptas nos diferentes segmentos do intestino delgado ($p>0,05$), conforme Tabela 1. Segundo, Uni et al. (2000a) em estudos utilizando a

técnica de PCNA, observaram que em 108 hs após a eclosão, quase todas as células do intestino delgado estavam proliferando e que 80% desta proliferação ocorria nas criptas.

Em seu estudo, Geyra et al. (2001) em experimentos com pintos de corte, observaram que ao nascimento, quase todas as células estavam em processo de proliferação, e que após 72 horas pós-eclosão, a proporção destas células PCNA positivas nas criptas decrescia com a idade em todos os segmentos do intestino, atingindo 50% de células em proliferação nas criptas, e 10-40% nos vilos.

Nos mamíferos é conhecido que a zona de proliferação celular restringe-se às criptas, e a zona de diferenciação e maturação celular está localizada na porção basal dos vilos. Assim por muito tempo acreditava-se que os mesmos padrões para diferenciação e maturação celular no intestino de aves seguiam os mesmos encontrados em mamíferos, e que a proliferação encontrava-se restrita às criptas, entretanto Uni et al. (1998) verificaram que em linhagens de poedeiras, as divisões celulares não se encontram restritas apenas nas cripta, mas que elas também ocorrem ao longo dos vilos.

Tabela 1. Médias do número de células PCNA positivas no ápice e cripta dos vilos da mucosa dos diferentes segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade

Variáveis	Tratamentos				Médias	Prob	CV (%)
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Duodeno							
Ápice/vilo	226,00	180,60	203,00	181,00	197,65	0,410	20,39
Cripta	487,80	414,80	434,00	432,60	442,30	0,096	11,76
Jejuno							
Ápice/vilo	252,80	238,80	212,00	226,00	232,40	0,760	16,43
Cripta	446,00	474,80	466,20	439,20	456,55	0,855	11,14
Íleo							
Ápice/vilo	218,00	259,00	254,20	212,60	235,95	0,152	10,33
Cripta	428,20	479,00	417,40	413,00	434,40	0,065	7,21

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação

No período de 14 dias de idade das aves, o número de células PCNA-positivas não foram influenciadas pelos tratamentos ($p>0,05$), conforme Tabela 2. De acordo com Marchini (2005) em experimento com frangos de corte, observou que o número de células proliferativas não alteravam com a temperatura ambiente cíclica elevada fornecida durante o período experimental, dados estes concordantes com o presente estudo.

De acordo Geyra et al. (2001), a diferenciação das células ocorre da cripta para o ápice dos vilos, sendo que ao nascimento quase todas as células ao longo das vilosidades foram PCNA-positivas para todos os segmentos do intestino delgado, sendo que o número de células em proliferação diminuiu com a idade de forma diferente para os segmentos intestinais. Às 168 h após a eclosão, esta diminuição foi de 10 a 20 %, e após este período a proporção proliferação celular: idade das aves manteve-se estável para todos os segmentos. Semelhante dinâmica foi observada em perus por Noy et al. (2001), em que a taxa de proliferação celular decresce rapidamente em 48 horas após a eclosão, passando de 100% para menos de 10% das células em proliferação nos vilos, e 50-60% nas criptas, em todos os segmentos do intestino delgado de perus mantidos em ambiente termoneutro.

Tabela 2. Médias do número de células PCNA positivas no ápice e cripta dos vilos da mucosa dos diferentes segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade

Variáveis	Tratamentos				Médias	Prob	CV
	Duodeno						
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Ápice/vilo	275,00	243,20	238,00	238,00	248,55	0,159	15,46
Cripta	423,60	424,00	445,80	448,20	435,40	0,932	12,80
Jejuno							
Ápice /vilo	307,00	314,80	348,40	348,40	329,65	0,983	19,38
Cripta	414,80	492,80	461,60	439,00	452,05	0,843	15,07
Íleo							
Ápice /vilo	307,20	304,00	252,40	310,00	293,40	0,173	12,76
Cripta	454,00	383,80	428,00	413,20	419,75	0,722	12,50

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$); L-GLn=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação

Aos 42 dias de idade, os diferentes tratamentos não influenciaram as variáveis em relação ao número de células mitóticas que foram marcadas pela técnica de imunohistoquímica ($p > 0,05$), conforme Tabela 3. Os resultados do presente estudo estão semelhantes aos encontrados por Marchini (2005), que trabalhando com frangos de corte em temperatura ambiente cíclica elevada (40°C) não observou efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de células PCNA-positivas.

Contudo, a taxa de proliferação celular diminui gradativamente da cripta para a região apical dos vilos. Assim, as divisões mitóticas nas criptas respondem por cerca de 55% de proliferação celular no intestino, a região média dos vilos por 32% e a região apical por 8% (APPLEGATE et al., 1994).

Tabela 3. Médias do número de células PCNA positivas no ápice e cripta dos vilos da mucosa dos diferentes segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico e em combinação aos 42 dias de idade

Variáveis	Tratamentos				Médias	Prob	CV (%)
	Duodeno						
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Ápice /vilo	225,80	203,00	215,00	219,40	215,80	0,574	12,37
Cripta	398,60	414,60	404,60	409,40	406,80	0,989	14,25
	Jejuno						
Ápice /vilo	218,40	208,00	241,40	212,20	220,00	0,754	19,02
Cripta	406,20	383,20	438,40	426,80	413,65	0,189	9,65
	Íleo						
Ápice /vilo	254,80	271,00	219,40	244,40	247,40	0,559	14,50
Cripta	414,00	407,00	395,60	457,40	418,50	0,371	12,22

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade; CV= Coeficiente de variação

CONCLUSÃO

A suplementação de aminoácidos sintéticos à ração de frangos de corte não influenciaram o número de células mitóticas dos segmentos do intestino delgado em nenhum dos períodos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPLEGATE, T.J., DIBNER, J.J., KITCHELL, M.L., UNI, Z., LILBURN, M.S. Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poul development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poul. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.124, p. 381-389, 1994.
- CREAMER, B., SHORTER, R.G., BARNFORTH, J. The turnover and shedding of epithelial cells, In the turnover in the gastrointestinal tract. **Gut**, v.2, p.110-118, 1961.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Guanabara-Koogan, 1992. 450p.
- ESPOSITO, J.P.; CAMARGO, R.S. LANGATTO FILHO, A.; LORETO, C.; KANAMURA, C.T.; TOLOSA, E.M.C. Expressão imuno-histoquímica dos

- marcadores PCNA, ki67 e p53 em carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 27 – nº5, p.327, 2000.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v.80, n. 6, p. 776-782, June 2001.
- MACARI, M. Mecanismos de proliferação e reparação da mucosa gastrintestinal em aves. SIMPÓSIO DE COCCIDIOSE E ENTERITE, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: [s.n.], 1995p.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal – FUNEP/UNESP, 1994, 296p.
- MAIORKA, A., BOLELI, I.C., MACARI, M., Desenvolvimento e Reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M., FURLAN, R.L., GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, p.113-123, 2002.
- MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA A.V.; SANTIN, E.; BORGES, A.S.; BOLELI I.C.; MACARI, M. Influência da suplementação de Glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.487-490. 2000.
- MARCHINI, C.F.P. **Efeito da temperatura ambiente cíclica elevada sobre os parâmetros produtivos, fisiológicos, morfométricos e proliferação celular da mucosa intestinal de frango de corte**. 2005. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2005.
- MINITAB® Statistical Software [computer program], version 16. State College, PA: **Minitab Inc**, 2010.
- NOY, Y.; GEYRA, A.; SKLAN,D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. **Poultry Science**, v. 80, n. 7, p. 912-919, July 2001.
- SELL, J.L.; ANGEL, C.R.; PIQUER, F.J.; MALARINO, E.G.; AL-BATSHAR, H.A. Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkey. **Poultry Science**. v.70, p.1200-1205, 1991.
- SMITH, M.W.; PEACOCK, M.A. Comparative aspects of microvillus development in avian and mammalian enterocytes. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.93, nº3, p.617-623.1989.
- UNI, Z., ZAIGER, G., GAL-GARBER, O., PINES, M., ROZENBOM, I., REIPEN, R. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. **British Poultry Science**, v.41, p.410-415. 2000.

- UNI, Z., PLATIN, R., SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. **Comparative Biochemisry Physiology**, v.168, p.241-247, 1998.
- UNI, Z.; GEYRA, H.; BEN-HUR, H.; SKLAN, D. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. **British Poultry Science**, London, v. 41, n. 5, p. 544-551, 2000a.
- WU, G.; KNABE, D.A.; YAN, W.; FLYNN, N.E. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **American Journal of Physiology**, v.268, p.R334-R342, 1995.

CAPÍTULO 5

AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE

AÇÃO DE GLUTAMINA E ÁCIDO GLUTÂMICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade das enzimas digestivas na mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com aminoácidos sintéticos na ração, sendo alojados 340 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb[®], com densidade populacional de 12 aves/m², por 42 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições de 17 aves cada. Os tratamentos foram: 1- Ração basal; 2- Ração basal com suplementação de 1% de glutamina; 3- Ração basal com suplementação de 1% de ácido glutâmico; 4- Ração basal com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico. Aos 7, 14 e 42 dias de idade, 96 aves foram eutanasiadas. Foram coletados segmentos do intestino delgado de oito aves por tratamento, totalizando 32 aves por período analisado, em que lavados com solução fisiológica gelada, pesados e em seguida congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente procedeu-se o descongelamento das amostras, que foram raspadas, pesadas e diluídas em quatro partes de água deionizada. O sobrenadante obtido foi coletado e incubado em substrato apropriado (maltose e sacarose), a partir da determinação do método da glicose oxidase, utilizando espectrofotômetro a 505nm. A fosfatase alcalina foi determinada por Kits comerciais em um comprimento de onda de 405nm. Aos 7 dias de idade, no segmento do duodeno e íleo, o tratamento controle apresentou maior atividade da enzima sacarase. Já no segmento do jejuno, as aves suplementadas com o tratamento que continha 1% de ácido glutâmico apresentou menor atividade de sacarase, enquanto que a fosfatase alcalina, apresentou maior atividade no tratamento controle. Nas demais idades, 14 e 42 dias, as enzimas não foram influenciadas. Assim, a atividade enzimática não foi influenciada pela suplementação de aminoácidos sintéticos na dieta de frangos de corte.

Palavras-chave: aminoácidos, aves, atividade enzimática, intestino.

ACTION OF GLUTAMINE AND GLUTAMIC ACID ON THE ACTIVITY OF INTESTINAL ENZYMES OF BROILER

ABSTRACT - This study was conducted to evaluate the activity of digestive enzymes in the intestinal mucosa of broilers supplemented with synthetic amino acids in the diet, being housed 340 chicks one day old, male, Cobb[®], with a density population of 12 birds/m² for 42 days were allocated. The design was completely randomized with four treatments and five replicates of 17 birds each. The treatments were: 1 - basal ration; 2 - basal ration supplemented with 1% glutamine; 3 - basal ration supplemented with 1% glutamic acid; 4 - basal ration supplemented with 2% of the combination of glutamine and glutamic acid. At 7, 14 and 42 days of age 96 birds were euthanized. Segments of the small intestine of eight birds per treatment were collected, totaling 32 birds per analysis period, washed with cold saline solution, weighed and frozen in liquid nitrogen. Subsequently proceeded thawing the samples, were scraped, weighed and diluted in four parts of deionized water. The supernatant obtained was collected and incubated in appropriate substrate (maltose and sucrose), the determination of the glucose oxidase method using a spectrophotometer at 505 nm. The alkaline phosphatase was determined by commercial kits a wavelength of 405nm. At 7 days of age, in the segment duodenum and ileum, the control treatment showed a higher activity of the enzyme sucrase. In jejunal segment, the birds supplemented with treatment containing 1% glutamic acid showed lower sucrase activity, while alkaline phosphatase higher activity in the control treatment. In other ages, 14 and 42 days, the enzymes were not influenced. Thus, the enzyme activity was not influenced by supplementation of synthetic amino acids in the diet of broilers.

Keywords: amino acids, birds, enzyme activity, intestine.

INTRODUÇÃO

O período de transição que vai desde a formação do embrião até o estágio pós-eclosão nas aves é crítico para o desenvolvimento de todos os sistemas, em particular o trato gastrointestinal, de maneira que algumas formas de manejo adotadas durante os primeiros dias pós-eclosão, podem melhorar o desempenho durante todo o ciclo de vida desses animais. Apesar de o trato gastrointestinal apresentar-se anatomicamente completo no final do período de incubação, este sofre sensíveis alterações morfológicas e fisiológicas, que preparam a ave para o consumo de dietas complexas. Durante o desenvolvimento embrionário, os nutrientes são supridos pelo ovo e após a eclosão, as aves iniciam a utilização de nutrientes provenientes das dietas, exigindo um período de adaptação do trato gastrointestinal desses animais, decorrente da mudança de alimentação. A literatura pertinente preconiza que a primeira semana de vida da ave tem especial importância nesse processo de maturação, no qual o tamanho relativo do intestino e a produção enzimática são otimizados (MAIORKA, 2002).

As enzimas digestivas presentes na membrana em escova dos enterócitos da mucosa intestinal são responsáveis pela digestão final de muitas das macromoléculas da dieta e apresentam papel importante na regulação da quantidade de nutrientes disponíveis para a absorção. Além da função digestiva, algumas das enzimas estão envolvidas em outras funções como o transporte de nutrientes, recepção de sinais intracelulares e regulação da diferenciação e crescimento celular (IJI et al., 2001).

Em frangos, as principais dissacaridases presentes na membrana apical dos enterócitos são a sacarase e a maltase (UNI et al., 2003). A sacarase (complexo sacarase-isomaltase) é a enzima responsável pela hidrólise de sacarose, isomaltose e, isomaltotriose. A sacarose é um dissacarídeo que está presente principalmente em

frutas, enquanto que a isomaltose se encontra em polissacarídeos de origem animal e vegetal como amido, glicogênio e celulose. Esta enzima apresenta atividade já em embriões de frangos, aumentado após o nascimento (BROWN, 1971). O complexo sacarase-isomaltase hidrolisa a união α 1-6 dos oligossacarídeos e dissacarídeos resultantes da digestão realizada pela amilase pancreática, formando glicose e frutose. Já a enzima maltase (maltase-glucoamilases) hidrolisa as uniões α 1-4 e α 1-6 dos dissacarídeos e oligossacarídeos liberando glicose. Esta dissacaridase é a mais abundante na membrana apical dos enterócitos (GALAND & FOSTNER, 1974).

No que se refere à atividade de proteínas de membrana na absorção intestinal, a glicose é absorvida pela membrana citoplasmática do ápice dos enterócitos, ao nível de microvilos, e seu movimento, assim como da sacarose, frutose e alguns aminoácidos: alanina, taurina e glutamina para dentro das células ocorre contra um gradiente de concentração, sendo, por isso realizado por um co-transporte com íons Na^+ , cuja concentração é maior fora do que dentro da célula, sendo realizado por transportadores de membrana (BOLELI et al., 2002).

Outra enzima importante para a digestão alimentar é a fosfatase alcalina, que em estudos com mamíferos, a sua presença na membrana em escova do intestino delgado, tem sido associada funções digestivas importantes relacionada a regulação da absorção de lipídeos, e atuando também como componente da barreira imune da mucosa do intestino, prevenindo a invasão de bactérias (GOLDEBERG et al., 2008).

Objetivou-se com este estudo avaliar as atividades enzimáticas das dissacaridasas (maltase e sacarase) e a fosfatase alcalina na mucosa do intestino delgado de frangos de corte suplementados com glutamina, ácido glutâmico e a associação de ambos os aminoácidos.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental, as dietas e o manejo utilizados foram descritos no Capítulo 2 “Material e Métodos” do experimento II, usado nas análises de morfometria entérica.

Os tratamentos foram estabelecidos a partir da substituição do amido de milho nas dietas por apresentarem valores energéticos semelhantes aos aminoácidos.

O número de aves foi alterado para esta análise. Aos 7, 14 e 42 dias de idade, um total de 96 aves, sendo que em cada período analisado foram transportadas até o Abatedouro Experimental da FMVZ – UNESP/Botucatu, 32 aves que foram insensibilizadas por eletronarcole e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. Posteriormente foi retirado o trato gastrointestinal destas aves e coletado os segmentos do intestino delgado, lavados em solução fisiológica gelada, pesados, acondicionados em frascos previamente identificados e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise da atividade das enzimas maltase, sacarase e fosfatase alcalina na mucosa intestinal.

Posteriormente as amostras foram descongeladas e em seguida realizadas a raspagem da mucosa com auxílio de uma lâmina de vidro. A mucosa foi pesada, diluída em água deionizada gelada numa proporção de 1:4 (peso: volume) e homogeneizada em homogeneizador tipo Turrax. O extrato obtido foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 14.000xg. Para a determinação das dissacaridases foi utilizado um espectrofotômetro a 505nm, de acordo com Dahlquist (1964). Aliquotas do homogeneizado foram incubados, com substratos apropriados (sacarose ou maltose) e a glicose liberada durante a reação foi determinada pelo método de glicose-oxidase, utilizando kits comerciais (Bioliqid - Laborclin – Brasil).

Para a determinação da fosfatase alcalina intestinal, o sobrenadante após descongelado foi adicionado ao Kit comercial (Fosfatase Alcalina – AMP – Laborclin – Brasil), de acordo com a metodologia indicada pelo fabricante e as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 405nm, em 3 tempos (0, 1, 2 e 3 min).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional SAS - Statistical Analysis System (versão 9.0), pelo procedimento *Proc MIXED*. As médias entre os tratamentos foram estimadas usando-se o LSMEANS e a comparação entre elas, quando necessária, realizada por meio da probabilidade da diferença (PDIFF), usando o teste de *Tukey* a 7%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 7 dias de idade, a atividade específica da enzima maltase não foi afetada pelos diferentes tratamentos, enquanto que a enzima sacarase apresentou no segmento do duodeno, uma maior atividade enzimática para o tratamento controle em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). No segmento de jejuno, o tratamento com 1% de ácido glutâmico foi que apresentou menor atividade da enzima sacarase. Já para o segmento do íleo, a atividade específica da sacarase foi maior para o tratamento controle, diferenciando dos demais tratamentos. Para a atividade específica da enzima fosfatase alcalina intestinal, no segmento do jejuno, o tratamento controle apresentou uma maior atividade em relação ao tratamento com 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico, não diferenciando dos demais tratamentos. Estes resultados apresentam-se discordantes dos encontrados por Sakamoto et al. (2011), que não encontraram diferença para estas enzimas em aves no mesmo período analisado e com dietas suplementadas com diferentes níveis da combinação de glutamina e ácido glutâmico.

Nesse estudo foi possível observar no tratamento controle alta atividade específica da sacarase, o que leva a inferir que esse resultado fosse devido à adição de amido de milho às dietas. Moran Jr. (1985) preconiza que a digestão e absorção de carboidratos são altamente adaptáveis de acordo com os níveis utilizados na dieta.

Segundo Traber et al. (1991), a expressão da fosfatase alcalina é um indicador da maturação dos enterócitos na mucosa intestinal, apresentando maior atividade no segmento de duodeno, sendo menor no segmento de íleo. De maneira similar a esses dados, os resultados encontrados mostraram diminuição da atividade da fosfatase alcalina desde o segmento de duodeno até o segmento de íleo. Em estudos com frangos de corte no qual a ração teve alta porcentagem de substituição do milho por sorgo desde o primeiro dia de vida dos frangos, foi constatado que a atividade da fosfatase alcalina e da maltase não foram afetadas no intestino dos mesmos (TORRES, 2010).

Tabela 1. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade

Variáveis	Tratamentos				Médias	Prob
	Duodeno					
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)		
Maltase	0,643	0,966	1,140	0,738	0,871	0,132
Sacarase	0,168A	0,148B	0,142B	0,147B	0,151	0,007
Fosf. Alc.	455,23	844,86	627,15	489,60	604,21	0,304
Jejuno						
Maltase	1,120	0,778	1,058	0,968	0,981	0,116
Sacarase	0,118A	0,124A	0,093B	0,120A	0,114	0,070
Fosf. Alc.	276,59A	222,78A	195,14AB	125,21B	204,93	0,068
Íleo						
Maltase	1,217	1,023	0,996	1,091	1,082	0,426
Sacarase	0,149A	0,123B	0,123B	0,113B	0,127	0,044
Fosf. Alc.	168,05	74,72	58,70	47,17	87,18	0,405

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,07$); Fosf. Alc. =Fosfatase Alcalina (U/L); L-GLn=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade.

Aos 14 dias de idade, a atividade das enzimas não foi influenciada pelos tratamentos nos diferentes segmentos (Tabela 2). Sakamoto et al. (2011) também não relataram influência dos tratamentos na atividade das enzimas nessa fase de criação, exceto diferença para a atividade específica da maltase no segmento de jejuno. Por outro lado, Pinheiro et al. (2004) em seus estudos com aves submetidas a restrição alimentar em período inicial de criação e com dieta não suplementado com complexo enzimático, mostraram um aumento da atividade da sacarase, amilase, e da lipase, imediatamente após o período de restrição. Por outro lado, foi verificado, que a atividade da maltase foi maior nas aves com restrição alimentar e que receberam uma suplementação na dieta.

Tabela 2. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade

Variáveis	Tratamentos				Médias	Prob
	Duodeno					
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)		
Maltase	0,786	0,753	0,677	0,731	0,737	0,887
Sacarase	0,160	0,153	0,163	0,159	0,158	0,791
Fosf. Alc.	581,27	589,93	298,76	415,15	471,28	0,262
Jejuno						
Maltase	0,793	0,991	1,037	1,038	0,965	0,330
Sacarase	0,111	0,130	0,122	0,127	0,122	0,522
Fosf. Alc.	417,00	457,63	462,88	471,81	452,33	0,979
Íleo						
Maltase	0,835	0,784	1,003	1,024	0,911	0,506
Sacarase	0,153	0,155	0,135	0,131	0,143	0,335
Fosf. Alc.	69,81	91,67	109,36	101,81	93,16	0,690

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,07$); Fosf. Alc. = Fosfatase Alcalina (U/L); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade.

Para o período de 42 dias de idade, a atividade das diferentes enzimas intestinais não foi influenciada pelos tratamentos (Tabela 3). Os resultados deste estudo discordam dos encontrados por Sakamoto et al. (2011), que observaram influência dos diferentes níveis da combinação de glutamina e ácido glutâmico sobre a atividade da sacarase

nesta mesma idade. Estudos realizados sobre a atividade das enzimas da borda em escova da mucosa do jejuno em frangos alimentados com diferentes níveis de substituição do milho pelo sorgo na ração também mostraram diminuição da atividade das enzimas aminopeptidase e maltase aos 42 dias de vida (TORRES, 2010). De maneira contrária, Pinheiro et al. (2004) verificaram aos 42 dias interação entre a restrição alimentar e suplementação enzimática com relação a atividade enzimática da sacarase e da maltase.

Em outro estudo com restrição alimentar, em frangos de corte aos 35 dias, Duarte (2009) encontrou diminuição da atividade enzimática da sacarase e maltase.

Tabela 3. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 42 dias de idade

Variáveis	Tratamentos					Médias	Prob
	Duodeno						
	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)			
Maltase	0,859	1,138	0,735	0,980	0,928	0,231	
Sacarase	0,138	0,133	0,130	0,140	0,135	0,924	
Fosf. Alc.	443,90	419,67	362,92	468,59	423,77	0,804	
	Jejuno						
Maltase	1,632	1,435	1,363	1,496	1,481	0,553	
Sacarase	0,094	0,028	0,068	0,051	0,060	0,252	
Fosf. Alc.	309,11	228,77	227,29	244,52	252,42	0,886	
	Íleo						
Maltase	1,530	1,320	1,451	1,511	1,453	0,864	
Sacarase	0,071	0,053	0,089	0,047	0,065	0,357	
Fosf. Alc.	83,28	81,08	121,98	83,93	92,57	0,224	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,07$); Fosf. Alc. = Fosfatase Alacina (U/L); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade.

CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi realizado, a adição de aminoácidos sintéticos na ração não influenciou a atividade específica das enzimas da mucosa intestinal de frangos de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. **Estrutura funcional do trato digestório**. In: Macari M.; Furlan R.L.; Gonzales E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: Funep; p. 75-96, 2002.
- BROWN, K.M. Sucrose activity in the intestine of the chick; Normal development and influence of hydrocortisone, actinomycin D, cycloheximide and puromycin. **Journal Experimental Biology**, v.177, p. 493-506, 1971.
- DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v.7, p.447-454, 1964.
- DUARTE, C.R.A. **Flexibilidade fenotípica do trato digestório: Efeitos da restrição alimentar e realimentação em frangos**. 2009. 104f. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências - Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2009.
- GALAND, G.; FORSTNER G. Membrane protein changes during induction of intestinal disaccharidases in suckling rats. **Gastroenterology**, v.66, p.693-693, 1974.
- GOLDBERG, R.F.; AUSTEN Jr., W.G. ZHANG, X.; MUNENE, G. MOSTAFA, G. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.9, p.3551-3556, 2008.
- IJI, P.A.; SAKI, A.; TIVEY, D.R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. **British Poultry Science**, v.42, p. 514-522, 2001.
- MAIORKA, A. **Efeitos da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte**. 2002. 103f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- MORAN Jr, E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through prenatal development. **Journal of Nutrition**, p.115: 665, 1985.
- PINHEIRO, D.F.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; VICENTINI PAULINO, M.L. Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. **Poultry Science**, v.83, p.1544-1550, 2004.
- SAKAMOTO, M. I.; FARIA, D. E.; NAKAGI, V. S.; NEGRÃO, J. A.; ARAÚJO, R. B.; SOUZA, K. M. R.; PREVIERO, T. C. Utilização de 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.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's Guide**: Version 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.

TORRES, K.A.A. **Avaliação do desempenho zootécnico, da função da mucosa intestinal e da microbiota ileal quando da substituição do milho pelo sorgo na ração para frangos de corte**. 2010. 90f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

TRABER, M P.G.; GUMUCIO, D.L.; WANG, W. Isolation of intestinal epithelial cells for the study of differential gene expression along the crypt-villus axis. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. V. 260, nº6, p. 895-903, 1991.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER,O.; SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v.82, P.1747–1754, 2003.

CAPÍTULO 6

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

A saúde intestinal vem sendo foco de várias pesquisas com o intuito de melhorar a produção de frangos, pois além da genética avançada melhorando constantemente essas aves, dos rigores da biosseguridade preservando sua sanidade e da alta tecnologia de ambiência garantindo a zona de conforto, a nutrição fornece as demais ferramentas para se obter um melhor desempenho zootécnico. Neste sentido, com o intuito de manter a saúde em equilíbrio, através da integridade do trato gastrointestinal, as características estruturais e funcionais do intestino delgado vêm sendo cada vez mais pesquisadas, principalmente nas primeiras semanas de vida das aves, pois a capacidade funcional do trato gastrointestinal apresenta limitações para o consumo de alimentos, digestão e absorção de nutrientes.

As pesquisas relacionadas as adversidades ocorrentes no trato gastrointestinal tem se intensificado e alternativas como a adição de agentes tróficos são estudadas a fim de estimular o crescimento e desenvolvimento da mucosa intestinal da ave, favorecendo o desempenho animal em busca de melhores índices produtivos para as aves. Dentre alguns agentes tróficos que parecem ter ação sobre a mucosa intestinal destacam-se as aminos biogênicas, aminoácidos, prebióticos, probióticos dentre outros.

A glutamina, um aminoácido livre, é considerada uma alternativa para melhorar o desenvolvimento da mucosa intestinal, como observado no presente trabalho, através do qual este aminoácido atuou preservando a integridade das vilosidades, além de aumentar o tamanho dos vilos, embora sua suplementação melhorou o desempenho nas fases iniciais de criação, apresentando melhor conversão alimentar.

Outro ponto a se considerar é que os efeitos da glutamina podem ser fundamentais em situações de desafios sanitários, ambientais e de manejo como: ocorrência de lesões na mucosa gastrointestinal, enterites, lesões causadas por *Eimeria*, que afetam o crescimento celular da mucosa, estresse por interferência de temperatura, vacinações, subnutrição. No entanto no presente estudo, o desafio sanitário com o uso de cama reutilizada não proporcionou a real atuação da glutamina como forma lesionar o trato intestinal e este ser reparado por sua atuação, restabelecendo a integridade, embora permitiu que os aminoácidos sintéticos interferissem no desempenho melhorando a conversão alimentar.

Quanto à utilização do ácido glutâmico em dietas para aves, é muito discutido a respeito do metabolismo deste aminoácido em relação a sua atuação nas células da mucosa entérica, e principalmente as vias metabólicas que se assemelham a glutamina. Os resultados do presente trabalho mostrou sua atuação positiva sobre a morfometria das diferentes túnicas que compõem a parede do intestino delgado, a integridade e maior número de vilos para o segmento do jejuno, mostrando sua eficiência na atuação do desenvolvimento intestinal. A associação de glutamina e ácido glutâmico atuando na mucosa intestinal ainda é controversa, necessitando de mais estudos sobre sua real atuação de maneira a preservar a integridade do intestino. A utilização destes produtos nas dietas de aves merecem mais estudos para determinar os níveis de inclusão, bem como seu efeito sobre a melhora no desempenho animal. Também é importante destacar o valor econômico deste produto que se torna inviável para as produções avícolas e a baixa disponibilidade no mercado, uma vez que a produto lançado no mercado não apresentou resultados satisfatórios como observados no presente trabalho.

Portanto, as pesquisas devem ser desenvolvidas com o intuito de melhor entender os processos de maturação do trato gastrointestinal, a atuação destes aditivos na mucosa intestinal, seus níveis de inclusão, bem como desafiar as aves como forma de determinar como funcionam estes aditivos em condições de campo, que representam maior interesse das empresas avícolas.