



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ARTURO PARDO LOZANO

**DESEMPENHO E PARÂMETROS FISIOHEMATOLÓGICOS  
DE LEITÕES DESMAMADOS, SUPLEMENTADOS COM  
GLUTAMINA NA RAÇÃO E DESAFIADOS COM  
LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI***

---

Londrina  
2013

ARTURO PARDO LOZANO

**DESEMPENHO E PARÂMETROS FISIOHEMATOLÓGICOS  
DE LEITÕES DESMAMADOS, SUPLEMENTADOS COM  
GLUTAMINA NA RAÇÃO E DESAFIADOS COM  
LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em  
Ciência Animal (Área de concentração Produção  
Animal) da Universidade Estadual de Londrina,  
como requisito parcial a obtenção do título de  
Doutor

Orientador: Prof. Dr. Caio Abércio da Silva

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L925de Lozano, Arturo Pardo.

Desempenho e parâmetros fisiohematológicos de leitões desmamados, suplementados com glutamina na ração e desafiados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* / Arturo Pardo Lozano. – Londrina, 2013.  
69 f. : il.

Orientador: Caio Abércio da Silva.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Suíno – Alimentação e rações – Teses. 2. Leitão (Suíno) – Desempenho – Teses. 3. Aminoácidos na nutrição animal – Teses. 4. Suplementos dietéticos – Teses. 5. Imunologia veterinária – Teses. I. Silva, Caio Abércio da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.085

ARTURO PARDO LOZANO

**DESEMPENHO E PARÂMETROS FISIOHEMATOLÓGICOS DE  
LEITÕES DESMAMADOS, SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA  
NA RAÇÃO E DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO DE  
*ESCHERICHIA COLI***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em  
Ciência Animal (Área de concentração Produção  
Animal) da Universidade Estadual de Londrina,  
como requisito parcial a obtenção do título de  
Doutor

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Caio Abércio da Silva  
UEL –Londrina – PR

---

Profa. Dra. Ana Maria Bridi  
UEL –Londrina – PR

---

Prof. Dr. Edgard Hideaki Hoshi  
UNOPAR –Londrina – PR

---

Prof. Dr. Emerson José Venancio  
UEL –Londrina – PR

---

Prof. Dr. José Mauricio Gonçalves dos Santos  
CESUMAR – Maringá – PR

Londrina, 28 de junho de 2013.

A la señora Libia y el señor Pardo, por dejarme soñar y apoyar todos mis proyectos sin dudar que serian realidad, a mis 4 hermanas (Mónica, Pilar, Jimena y Claudia) que son mis cómplices y consejeras de vida y fueron parte importante de la persona que soy hoy en día.

A mis enanos (Daniela, Sebastián, Gabriela, Juanita y Valentina) que lo único que me dan es alegría y amor desmedido, los amo de gratis

A Ana Paula, que com seu exemplo me incentiva a ser cada dia melhor, paciente nas horas que não encontro o caminho, obstinada e com um inesgotável amor pela sua profissão, me escolho para compartilhar seus medos e anseios durante esta longa caminhada que começamos faz tempo...

**Cuando nacemos no sabemos ni siquiera nuestro nombre, ni cual será nuestro sendero ni lo que el futuro esconde. Entre el bautizo y el entierro cada cual hace un camino, y con sus decisiones un destino.**

**Ruben Blades**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar o que preciso, dia a dia na medida certa.

À Universidade Estadual de Londrina pelo suporte durante minha época de pós-graduação. Foram momentos inolvidáveis rodeado de pessoas e profissionais maravilhosos.

Aos meus pais por sua paciência e apoio durante estes seis anos de caminhada em procura do meu sonho.

Ao Professor Dr. Amauri Alcindo Alfieri, por sua disponibilidade desde o mestrado, pelo seu exemplo de profissionalismo e firmeza na coordenação do programa de Ciência Animal.

Ao Professor Dr Caio Abércio da Silva, por sua orientação, amizade, conselhos e momentos inesquecíveis que fizeram desta etapa acadêmica uma jornada gratificante, enriquecedora e plena, acrescentando valores, experiências e conhecimentos.

À Professora Dra Ana Maria Bridi, por sua amizade, dicas, conselhos e orientações, sempre atenta aos pedidos de ajuda nas horas de trabalho árduo.

Ao Professor Dr Emerson José Venancio, pelo auxílio e paciência na ajuda das análises do ELISA, e sua orientação na interpretação e discussão de dados.

À Helenice, por ser meu anjo da guarda sempre disposta a solucionar e esclarecer todos os problemas e dúvidas que apareceram ao longo destes 6 anos, meu agradecimento eterno.

À Angela Poveda pela parceria e amizade na realização do meu projeto de doutorado.

À Juliana Fritzen, pela sua incalculável ajuda e múltiplas dicas na preparação e estocagem do LPS, sempre aberta a esclarecer as dúvidas que se apresentaram na condução do experimento.

Aos colegas da suinocultura que sempre estiveram prontos para trabalhar, Eduardo Raele (Duraele), David Gavioli (Dominic), Roberta Abrami (Lora), Graziela Drociunas (Gra), Aline Alves da Silva (Alininha), Aliny Novais, Julio Cesar Morais, Carlos Melanda (Carlão).

Aos colegas da pós-graduação, Filipe Castro (Pendejo), Fernando Massaro, Gianne Evans Cunha, Juan Carlos Henao, Fernando Paiva, Nayara Andreo.

Aos funcionários da fazenda escola, seu Pedro, Hermínio, seu Antonio, George e Zé, vigiando e ajudando no manejo dos animais durante o decorrer dos experimentos.

Ao Programa de Estudante Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) Capes, por me ceder à bolsa e garantir que eu pudesse realizar o Doutorado.

Meu sincero, muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram ou apoiaram para que este sonho tornasse realidade.

LOZANO, A. P. **Desempenho, atividade imune, sistema de alojamento e hemograma de leitões desmamados alimentados com glutamina dietética e desafiados com LPS.** 2013. 69 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina. 2013.

## RESUMO

Objetivou-se com o trabalho avaliar os efeitos da suplementação de diferentes níveis de glutamina dietética (0; 1,0; 1,5; 2,0%) para leitões desmamados associados a duas condições: submetidos ou não a desafios com 0,3 µg lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS); e sob duas condições de alojamento (creches caracterizadas com diferentes fatores de risco). Por tanto foram desenvolvidos dois experimentos. No primeiro experimento foram avaliados 4 níveis de L-glutamina dietética e duas situações de desafio (Creche I, com baixos fatores de risco; e Creche II, com altos fatores de risco), definindo um desenho experimental em modelo fatorial 4 x 2. Foram utilizados quarenta e oito leitões com 21 dias de idade, alojados em número de 2 por baia, um macho castrado e uma fêmea, avaliados durante 30 dias. Houve interação dos fatores para a conversão alimentar, onde para os animais da Creche I níveis crescentes de glutamina promoveram melhora da conversão alimentar. Para o fator alojamento, os animais da Creche I apresentaram melhor ( $P \leq 0,05$ ) ganho diário de peso, consumo diário de ração e peso final, e menor incidência e intensidade de diarreia. A glutamina demonstrou ser benéfica para a conversão alimentar, quando as condições de ambiente apresentaram baixos fatores de risco; e a condição ambiental com baixos desafios sobrepõe a ação da glutamina para características de ganho de peso e consumo de ração. No segundo experimento foram avaliados 4 níveis de L-glutamina dietética e duas situações de desafio (sem LPS e com LPS, administrados no 22º, 23º, 24º, 25º e 26º dias do período experimental). Foram avaliados o desempenho, o perfil sérico de cortisol e o leucograma. As coletas de sangue realizadas nos 22º, 24º, 26º e 28º dias de experimento. Foram utilizados 96 animais, desmamados aos 21 dias de idade, alojados em número de dois por baia (um macho castrado e uma fêmea), durante 30 dias. Foi observado efeito quadrático para o ganho diário de peso para os animais não desafiados, com ponto de máxima (0,303 kg/dia) para 0,41% de glutamina e efeito linear negativo para a conversão alimentar de animais desafiados. Houve interação para o número de leucócitos totais entre os teores de glutamina e LPS e efeito linear dos teores de glutamina dos animais não desafiados sobre o número de leucócitos totais. Para neutrófilos e linfócitos houve efeito quadrático apenas dos teores de glutamina. A suplementação de glutamina em até 2% na dieta melhora a conversão alimentar dos animais submetidos ao desafio com LPS e favorece a imunidade celular sérica de leitões após o desmame.

**Palavras-chave:** Cortisol. Creche. Imunidade. Produção. Suínos.

**LOZANO, A.P Weaning piglets performance, immune activity, house system and blood count, feeding with dietary glutamine and challenged with LPS.** 2013. 69p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina. 2013.

### **ABSTRACT**

The aim in this was to evaluate the effects of different levels of dietetic glutamine (0; 1.0; 1.5; 2.0%) to weaning piglets associated with two conditions: submitted or not to 0.3 µg Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS) challenge; and two housing conditions (nurseries characterized with different presences of risk factors). Two experiments were well characterized. In the first, were evaluated four levels of dietetic L-glutamine and two challenge conditions (Nursery I, with low risk factors level and Nursery II, with high risk factors level), setting a 4x2 factorial experimental design. Forty eight piglets with 21 days, allocated two per bay, one barrow and one female, were evaluated during 30 days. There was an interaction for feed conversion ratio with an improvement when the levels of glutamine were increased for the Nursery I animals. For the housing factor, animals allocated at Nursery I had better ( $P < 0.05$ ) average daily gain, daily feed intake and final weight, and lower incidence and severity of diarrhea. The glutamine had better feed conversion ratio, when the ambient conditions presented lower risk factors; and the ambient conditions with low challenge overrides the actions of glutamine to average gain and feed intake. In the second, were evaluated four levels of dietetic L-glutamine and two challenge situations (without LPS a with LPS, given on day 22°, 23°, 24°, 25° e 26° of experimental period) and the performance and profile of serum cortisol and leukocyte were evaluated. The blood samples were performed on day 22°, 24°, 26° e 28°. A total of 96 animals were used, weaned at 21th day, allocated two per cage (a barrow and a female), during 30 days. It was observed quadratic effect for average daily gain to non-challenged animals, with the point of maximum (0.303 kg / day) to 0.41% glutamine and negative linear effect for feed conversion ratio of challenged animals. There was interaction for the variable total number of leukocytes between glutamine levels a LPS and was observed too for this variable linear effect of glutamine levels. Only the glutamine levels presented quadratic effect for neutrophils and lymphocytes. Glutamine supplementation up to 2% in the diet improves feed conversion ratio for LPS challenged animals and promotes cellular immune serum of piglets after weaning.

**Keywords:** Cortisol. Immunity. Nursery. Production. Swine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –	Estrutura da Glutamina .....	15
<b>Figura 2</b> –	Interconversão Glutamina – Glutamato .....	15
<b>Figura 3</b> –	Participação da glutamina na proteção do epitélio intestinal.....	17

## LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 Efeito da glutamina e do LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) no desempenho de leitões desmamados e alojados em dois tipos de creche.

<b>Tabela 1</b> – Composição centesimal e calculada da ração basal experimental.....	42
<b>Tabela 2</b> – Relação das variáveis objetivas analisadas com os respectivos valores para avaliar os leitões na fase de creche e resultados obtidos nas creches estudadas.....	43
<b>Tabela 3</b> – Médias do desempenho de leitões desmamados e desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> ), suplementados com diferentes teores de glutamina em dois tipos de creche.....	44
<b>Tabela 4</b> – Número de leitões que apresentaram diarreia em dois diferentes tipos de instalações .....	46

ARTIGO 2: Desempenho, cortisol e células de defesa de leitões na fase de creche desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) e suplementados com diferentes níveis de glutamina.

<b>Tabela 1</b> – Composição centesimal e calculada da ração basal experimental.....	52
<b>Tabela 2</b> – Médias e coeficientes de variação do desempenho de leitões desmamados desafiados e não desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> ) suplementados com diferentes teores de glutamina na fase de creche.....	54
<b>Tabela 3</b> – Valores de cortisol sérico (ng/mL) em função dos teores de glutamina na ração e desafiados ou não com LPS (Lipopolissacarídeo de <i>E.coli</i> ).....	57
<b>Tabela 4</b> – Valores do leucograma de leitões em função dos teores de glutamina e Desafiados ou não com LPS (lipopolissacarídeo de <i>E.coli</i> ).....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	GLUTAMINA .....	14
2.2	SÍNTESE DE GLUTAMINA .....	15
2.3	METABOLISMO DA GLUTAMINA NO ÍNTESTINO .....	16
<b>3</b>	<b>SISTEMA IMUNOLÓGICO</b> .....	19
3.1	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNE NO LEITÃO .....	20
3.2	DESENVOLVIMENTO DA IMUNIDADE INATA .....	21
3.3	DESENVOLVIMENTO DA IMUNIDADE ADQUIRIDA .....	21
3.4	PAPEL DA GLUTAMINA NA RESPOSTA AO DESAFIO SANITÁRIO .....	22
<b>4</b>	<b>ENDOTOXINAS</b> .....	25
<b>5</b>	<b>RESPOSTA IMUNE CONTRA LIPOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS (LPS)</b> .....	26
<b>6</b>	<b>DIARREIA PÓS-DESMAME</b> .....	27
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>7</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
7.1	OBJETIVO GERAL .....	37
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>8</b>	<b>ARTIGOS 1 PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	38
8.1	INTRODUÇÃO .....	39
8.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	40
8.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
8.4	CONCLUSÕES .....	46
8.5	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

<b>9</b>	<b>ARTIGO 2 PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	49
9.1	INTRODUÇÃO .....	50
9.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
9.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
9.4	CONCLUSÕES .....	63
9.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

O desmame na suinocultura intensiva ocorre precocemente, sendo ainda considerado um período muito crítico na vida dos leitões (HAMPSON; PLUSKE; PETHICK, 2001). As perturbações associadas ao desmame ocorrem principalmente em decorrência da mudança no tipo de alimento (líquido para sólido) e ao início de um regime adverso de refeições e de estresse social, já que os animais perdem a referência materna e de seus irmãos (WEARY; JASPER; HÖTZEL, 2008).

Associado a esses fatos, no nível intestinal ocorrem alterações morfológicas e funcionais importantes, como a redução da altura das vilosidades e aumento da profundidade das criptas intestinais (VARLEY; MILLER, 2002). Com relação às mudanças que suportam a nutrição do leitão, após a separação da mãe o amido torna-se a principal fonte energética para o desmamado e a proteína do leite é substituída por proteínas vegetais, o que implica em adaptação morfológica, enzimática e metabólica (FREIRE, 1998), aumentando o pH estomacal, que passa de 3,8 para 4,3 (ROSTAGNO; PUPA, 1998), propiciando grandes alterações na microbiota intestinal, reduzindo a população de bactérias benéficas e aumentando as patogênicas que produzem metabólitos tóxicos, podendo causar inflamações na mucosa intestinal do hospedeiro (SILVA; NORNBORG, 2003).

Este conjunto de alterações representa um momento de estresse para o animal, como consequência também da insuficiente capacidade de produzir secreções digestivas para degradar compostos diferentes daqueles presentes no leite materno (LIU; BAIDOO, 1997), resultando em aumento dos níveis do fator de liberação de corticotrofina (CRF) e cortisol séricos, que influenciam o comportamento animal (MOESER et al., 2007). Frequentemente, pela ativação do sistema imune, estas alterações coincidem com a produção exacerbada de citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), que interfere no metabolismo e regula o desempenho animal, aumentando a temperatura corporal, reduzindo o consumo de alimentos, além da partição de nutrientes para fins de pouco interesse zootécnico (PIÉ et al., 2004)

Dentre muitos recursos dirigidos para a minimização dos danos do pós-desmame, a suplementação da dieta com glutamina (GLN) representa uma das ferramentas recentes de grande êxito que favorecem a alta replicação das células do trato gastrointestinal (TGI) e as do sistema imune, como linfócitos e macrófagos (ELLIOTT; BIOURGE, 2006).

Apesar de ser o aminoácido mais abundante no plasma e no tecido muscular (SHABERT; EHRLICH, 1994), a síntese de GLN pode não ser suficiente para corresponder ao aumento da absorção e do metabolismo do TGI, bem como para atender a demanda do

sistema imunológico em algumas situações, como nos casos patológicos, sendo assim classificada como aminoácido condicionalmente essencial (ELLIOTT; BIOURGE, 2006).

Sob alta demanda do sistema imunológico, a síntese muscular de GLN é frequentemente insuficiente e a concentração sérica decresce (ELLIOT, 2004). Fontes pobres de GLN, associada a doenças que aumentam a necessidade da mesma, podem resultar em comprometimento do sistema imunológico devido à diminuição da produção de anticorpos e da redução da barreira da mucosa do intestino, aumentando assim o risco de infecções que podem evoluir para um quadro de septicemia (ELLIOT; BIOURGE, 2006). Estas observações suportam o conceito de que este aminoácido pode tornar-se essencial na dieta durante períodos de estresse (FIELD et al., 2000).

Diante da importância da glutamina no metabolismo animal, faz-se necessário avaliar a eficiência da suplementação de diferentes níveis de glutamina às rações, sobre o desempenho, hematologia, imunologia e ambiência de leitões desafiados com o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na fase de creche.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GLUTAMINA

Glutamina (GLN) é o aminoácido livre mais abundante na circulação e nos espaços intracelulares. Além disso, é precursor da síntese de outros aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucleicos, açúcares aminados, proteínas e muitas outras moléculas biologicamente importantes (SMITH, 1990). A síntese de purina, pirimidina e de açúcares aminados, elementos básicos dos nucleotídeos, ocorre no citoplasma, sendo essenciais para o reparo da mucosa intestinal (STRYER, 2008), enquanto que o metabolismo do esqueleto de carbono da GLN se inicia por sua desaminação pela glutaminase dependente de fosfato na mitocôndria (CURTHOYS; WATFORD, 1995).

A GLN tem grande importância em vários processos metabólicos, sendo indispensável para o crescimento da maioria das células e tecidos (PIERZYNOWSKY et al., 2001), participando da gliconeogênese, síntese de uréia, homeostase do pH e neurotransmissão. Por ter em sua estrutura dois grupos nitrogenados facilmente mobilizáveis (Figura 1), a GLN pode funcionar como veículo para intercâmbio tissular de nitrogênio e amônia, da periferia para os órgãos viscerais (DARMAUN; HUMBERT, 2000).

A GLN é um aminoácido sintetizado por vários tecidos corporais, sendo classificado como não essencial (LACEY; WILLMORE, 1990). No entanto, essa classificação tem sido questionada, pois em situações críticas, como processos cirúrgicos, traumas e exercícios físicos exaustivos, a síntese de glutamina não supre a exigência do organismo (SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007; WRAY; MAMMEN; HASSELGREN, 2002)

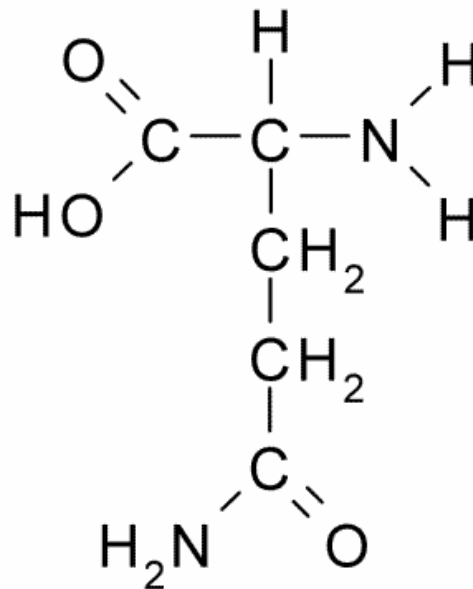
A GLN é o principal substrato energético de células de proliferação rápida, como enterócitos e linfócitos ativados (CYNOBER, 1999). O aminoácido é um substrato essencial na síntese de mucina e na manutenção de barreiras contra ataques de bactérias (REEDS; BURRIN, 2001). Além disso, a GLN é o principal aminoácido para a síntese endógena de arginina na maioria dos mamíferos, como suínos, bovinos e ovinos, via eixo intestinal-renal. Esta via sintética compensa uma deficiência da arginina (essencial para neonatos) no leite durante o período de amamentação e o intenso catabolismo da arginina dietética pelo intestino delgado nos animais recém-desmamados (WU; MORRIS, 1998).

O principal tecido corporal produtor de GLN é o músculo esquelético, responsável pela manutenção dos níveis plasmáticos e por prover outros tecidos importantes

(pulmonar, renal, intestinal e adiposo) com o aminoácido (PIVA; BACH KNUDSEN; LINDBERG, 2001).

A GLN e a alanina são as principais moléculas utilizadas no transporte de grupos amino dos tecidos até o fígado, onde ocorre a remoção do nitrogênio. O esqueleto de carbono deste metabolismo é destinado à gliconeogênese (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). A hidrólise da glutamina resulta na formação do glutamato, que pode ser utilizado na síntese proteica ou convertido em  $\alpha$ -cetoglutamato, que será oxidado no ciclo de Krebs, resultando na produção de trifosfato de adenosina (ATP) (SOUBA; SMITH; WILMORE, 1985).

**Figura 1** –Estrutura da Glutamina

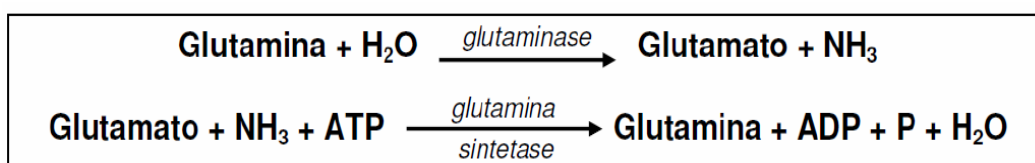


**Fonte:** Lehninger; Nelson; Cox, 1995.

## 2.2 SÍNTESE DE GLUTAMINA.

A biossíntese de GLN a partir do glutamato e da amônia é catalisada pela glutamina sintetase numa reação dependente de ATP (Figura 2).

**Figura 2** –Interconversão Glutamina – Glutamato.



**Fonte:** Watford et al, 2002.

No tecido intestinal a expressão da enzima glutaminase é alta. Em órgãos com grande exigência de glutamina como rins e pulmões, a enzima glutaminase, responsável pela hidrólise da glutamina, tem atividade elevada (REEDS; BURRIN, 2001). A glutaminase, nos mamíferos, apresenta-se sob duas isoformas, uma localizada no fígado, denominada hepática, e outra nos demais órgãos, principalmente cérebro, intestinos e rins, sendo a última isoforma denominada glutaminase renal, devido sua caracterização inicial ter sido feita nos rins (POMPÉIA, 2000).

Estudos conduzidos por Reeds e Burrin (2001) mostram que as células das criptas e das vilosidades sintetizam simultaneamente GLN, sugerindo que este aminoácido pode não ter papel estritamente metabólico no intestino. A GLN pode apresentar papel mais regulatório que metabólico, já que ativa uma série de genes associados com o ciclo de progressão das células na mucosa. Neste sentido, inibir a síntese da GLN significa diminuir a proliferação e a diferenciação de células da mucosa (REEDS; BURRIN, 2001; BLIKSLAGER et al, 1999; RHOADS et al., 1997).

### 2.3 METABOLISMO DA GLUTAMINA NO INTESTINO

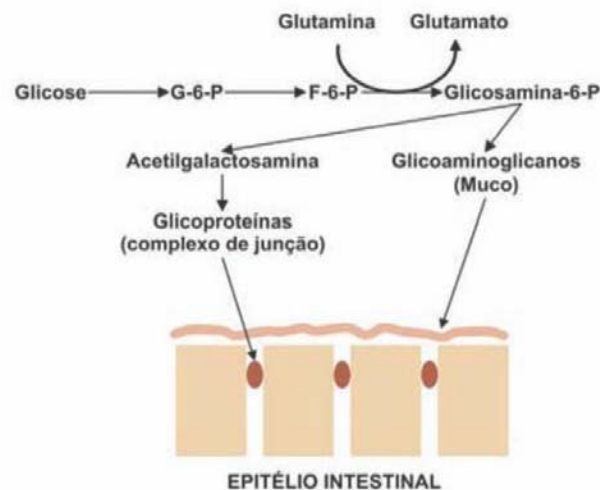
A GLN dietética não está sujeita à significativa hidrólise ácida no estômago e na parte superior do duodeno, estando, portanto, efetivamente disponível no intestino delgado para ser absorvida e utilizada metabolicamente. Em estado pós-pandrial a absorção de GLN ocorre a partir do lúmen intestinal através da membrana de borda em escova do enterócito. Quanto maior a concentração de GLN no lúmen, mais esta será transportada pelo sistema transportador de N dependente de sódio e liberada no sangue via sistema porta. O trato gastrointestinal é o órgão que mais utiliza a GLN, sendo responsável por extrair 20% de GLN circulante em estado pós-absortivo (SOUBA et al., 1990), sendo a captação desse aminoácido realizada principalmente nas células epiteliais dos vilos do intestino delgado (FISCHER DA SILVA, 2001; PADOVESE, 2000; VASCONCELOS; TIRAPEGUI, 1998). Sua metabolização pelos enterócitos, em estados normais ou patológicos, é uma etapa importante na regulação intestinal do balanço nitrogenado, sendo que em casos de estresse e doenças a GLN pode ser um componente dietético (PALANCH, 2000).

A mucosa intestinal dos mamíferos é o tecido corporal de mais rápida replicação. A renovação das células epiteliais do intestino (proliferação, migração, diferenciação dos tecidos e apoptose) e dos constituintes da barreira intestinal são processos dinâmicos afetados pelo estado nutricional e pela adequação de nutrientes específicos da dieta

(ZIEGLER et al., 2003), dentre eles a GLN. A GLN desenvolve também um papel importante na sustentação da função da mucosa intestinal, isto porque o muco e o complexo de junção, que protegem o epitélio intestinal, são ricos em glicoproteínas que são sintetizadas a partir de glucosamina-6-fosfato, cuja síntese participa a GLN (Figura 3) (ABREU; DONZELE, 2007).

O mecanismo pela qual a GLN estimula a proliferação de células intestinais não é bem conhecido. Rhoads et al. (1997), trabalhando com o jejuno de suínos, sugeriram que existem dois eventos associados com a oxidação da GLN e a proliferação de células intestinais, a estimulação das trocas sódio/hidrogênio ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) na membrana do enterócito e o aumento da atividade específica da enzima ornitina descarboxilase (ODC). Ambas aumentam a produção de poliaminas que atuam na maturação e regeneração da mucosa intestinal (WANG; LI; PATEL, 1998).

**Figura 3** – Participação da glutamina na proteção do epitélio intestinal



**Fonte:** Abreu e Donzele 2007.

Ziegler et al. (2003) descreveram que além da glutamina ser utilizada como substrato energético e estar associado à proliferação celular, sua atividade no intestino está relacionada ao estímulo da síntese protéica, inibição da apoptose, aumento do número e função das células do sistema imunológico associadas à mucosa, diminuição da translocação de bactérias, diminuição da resposta inflamatória, regulação da produção de glutathiona na mucosa, regulação das proteínas de choque térmico, entre outros fatores.

Particularmente, quanto ao intestino, a importância da GLN para este órgão é evidenciada pelo fato da GLN dietética ser degradada durante sua passagem pelo intestino delgado (STOLL; HENRY; REED, 1998).

Assim, a suplementação com glutamina na dieta de leitões desmamados mostra resultados satisfatórios. Wu, Meier e Knabe (1996) verificaram que suínos desmamados que receberam ração suplementada com 1,0% de GLN apresentaram, aos sete dias após o desmame, as vilosidades do jejuno preservadas, e na segunda semana pós-desmame, uma melhor conversão alimentar. Kitt et al. (2001) relataram que essa mesma suplementação melhorou o desempenho zootécnico de leitões desmamados, mas não influenciou a altura das vilosidades nos primeiros quatro dias após o desmame. Lackeyram, Yue e Fan (2001) reportaram que a suplementação de 0,8% de L-glutamina em dietas à base de milho e farelo de soja para leitões submetidos ao desmame precoce aos dez dias de idade, em um estudo de 12 dias, foi eficaz no incremento do ganho de peso corporal, promoveu um maior desenvolvimento do intestino delgado e determinou o crescimento de outros órgãos viscerais. Já, House, Pencharz e Ball, (1994) observaram que suínos alimentados com dietas contendo 1,5% de L-glutamina apresentaram aumento do peso vivo, porém sem mudanças no conteúdo de proteína, gordura e cinzas na carcaça. Todavia, Yoo, Field e Mcburney. (1997) não observaram diferenças na inclusão de 4% L-glutamina na dieta de leitões desmamados expostos à infecção bacteriana em relação a animais não infectados, sendo que os níveis de glutamina muscular e a resposta imune apresentaram-se sob níveis normais.

### 3 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Numa resposta imune, o animal recorre a múltiplos sistemas de defesa sobrepostos e interligados que interagem para destruir o agente agressor. Estes conjuntos de recursos contemplam defesas inatas e adquiridas (OMS 1993; TIZARD, 2009).

Todavia, o sistema imunológico dos suínos ao nascimento é imaturo, só alcançando um nível de desenvolvimento adequado ao redor dos 35 dias de vida; (ALLEE; TOUCHETTE, 1999; MEDEL; LATORRE; MATEOS, 1999; GATNAU; MATEOS; LÁZARO, 1995).

A resposta imune pode ser classificada em natural e adaptativa, com o objetivo de discriminar os elementos envolvidos na mesma. Ambas ocorrem de forma simultânea, mas as células envolvidas e a comunicação bioquímica entre elas são diferentes. Fagócitos, células *natural killer* e citocinas derivadas de macrófagos relacionam-se à resposta imune inata. Já a resposta imune adaptativa possui como elementos principais os linfócitos T e B e as citocinas produzidas por eles. Na resposta imune adaptativa um segundo encontro com o agente agressor induz a uma reação mais rápida e mais efetiva, caracterizando a memória imunológica (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2007).

A resposta imune também pode ser dividida em fase indutora e efetora. A fase indutora é composta por uma etapa cognitiva, na qual o antígeno, que é um agente estranho ao organismo, é apresentado ao sistema imune; e por uma etapa denominada ativação, durante a qual o antígeno provoca uma série de reações de ativação, proliferação e diferenciação celular. Na fase efetora o sistema imune gera processos humorais e celulares que normalmente levam à eliminação do antígeno (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

O sistema imune adaptativo dos vertebrados é dividido em dois segmentos funcionais: imunidade humoral e imunidade celular. A resposta imune humoral caracteriza-se pela presença de substâncias solúveis, os anticorpos, os quais são produzidos pelas células B, enquanto que os linfócitos T exercem um papel central no desenvolvimento da resposta imune celular e é caracterizado pela ativação de células citotóxicas como os linfócitos T citotóxicos e os macrófagos (SANTIN, 2007).

### 3.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNE NO LEITÃO

O desenvolvimento do sistema imune no feto de mamíferos segue um padrão consistente, com uma série de etapas, sendo que à medida que evolui a gestação as respostas aos antígenos são mais efetivas (TIZARD, 2009).

Durante a gestação o feto encontra-se num ambiente que guarda uma proteção eficiente contra uma grande variedade de antígenos e que não permite a transferência de anticorpos maternos via placenta. O neonato, portanto, é considerado imunodeficiente quando comparado ao adulto (McCAULEY; HARTMANN, 1984). Há vários fatores que contribuem para a imunodeficiência neonatal, uma delas é a baixa quantidade de linfócitos B no sangue ao nascer ( $320 \pm 40 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  contra  $640 \pm 90 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  nos animais adultos) que permanece até os 10 dias de idade e aumenta gradualmente a níveis de um suíno adulto em um período de 5 semanas (McCAULEY; HARTMANN, 1984). O neonato apresenta uma baixa expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002). Um menor número de APC também limita a resposta imune (KELLY; COUTTS, 2000).

O número de leucócitos totais e neutrófilos também é mais baixo ao nascer ( $4470 \pm 3000 \times 10^3$  e  $2380 \pm 310 \times 10^3$  célula  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente). Após o nascimento a percentagem de linfócitos cai de  $47,4 \pm 3,3\%$  para  $35,2 \pm 1,7\%$  e permanece neste nível até o quinto dia pós-parto. Essa proporção aumenta para  $65,6 \pm 2,5\%$  aos 20 dias pós-parto. Aos 10 dias a quantidade de leucócitos totais passa de  $2040 \pm 120$  para  $5940 \pm 550 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  e após o nascimento o número de neutrófilos segue aumentando ( $5370 \pm 580 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) até 10 dias pós-parto, quando então se mantém (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002).

McCauley e Hartmann (1984), trabalhando com leitões, afirmaram que as altas concentrações de cortisol sanguíneo ( $93 \pm 11$  ng/mL), valor 12 vezes maior que no suíno adulto ( $15,5 \pm 1,2 \mu\text{g/litro}^{-1}$ ), contribui com a imunodeficiência neonatal, pois os glicocorticoides suprimem a função imune (HOSKINSON; CHEW; WONG, 1990), interferindo na dinâmica dos leucócitos (McCAULEY; HARTMANN, 1984). As concentrações de cortisol no plasma em leitões diminui em 50% às 6 semanas de idade (HOSKINSON; CHEW; WONG, 1990). Altas concentrações de cortisol também estão relacionadas com o início do parto e com o estresse do nascimento.

### 3.2 DESENVOLVIMENTO DA IMUNIDADE INATA

O sistema imune adquirido é insipiente ao nascimento e como resultado é pouco eficiente. As respostas imunes inatas são, portanto, essenciais para a sobrevivência nas primeiras semanas de vida. Os recém-nascidos, produzem uma quantidade diversificada de moléculas antimicrobianas, incluindo componentes do complemento em baixos níveis (TIZARD, 2009).

Os neutrófilos do feto suíno aos 90 dias após a concepção são totalmente capazes de fagocitar bactérias como *Staphylococcus aureus*. No entanto, nesse período eles são deficientes na atividade bactericida, alcançando os níveis do animal adulto somente por volta do dia 100 de concepção. Próximo ao nascimento a capacidade fagocítica e bactericida desses neutrófilos declinam como resultado de um aumento dos níveis de esteróides (OLIN et al., 2005).

Também ocorrem alterações interessantes na distribuição dos macrófagos no suíno recém-nascido. Em neonatos existem poucos macrófagos pulmonares intravasculares. Durante os primeiros dias após o nascimento, contudo, monócitos sanguíneos se aderem a capilares pulmonares endoteliais e se diferenciam em macrófagos. Assim, no leitão recém-nascido, 75% das partículas são removidas do sangue pelo fígado e baço, mas com dois meses de idade, 75% são depurados nos pulmões. Os macrófagos alveolares dos suínos recém-nascidos apresentam atividade fagocítica fraca, mas isso é eficientemente adquirido com sete dias de idade (BROWN et al., 2006).

### 3.3 DESENVOLVIMENTO DA IMUNIDADE ADQUIRIDA.

Os tecidos linfóides intestinais dos animais neonatos respondem rapidamente aos antígenos ingeridos. Por exemplo, leitões vacinados por via oral, com três dias após o nascimento, desenvolvem anticorpos neutralizantes no intestino 5 a 14 dias mais tarde (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 1994). Boa parte dessa resistência precoce é atribuída à produção inata de IFN- $\alpha$ , mas existe também uma resposta precoce de imunoglobulina M (IgM) intestinal que muda para IgA em duas semanas. Nos animais jovens a resposta de IgA aparece mais cedo e alcança níveis do animal adulto bem antes das outras imunoglobulinas. Esta rápida resposta do trato intestinal não sensibilizado é também verificada em suínos livres de germes. Nesses animais a síntese de anticorpos no intestino pode ser detectada 4 dias após a infecção por *E. coli* (BUTLER et al., 2002). Na ausência de

anticorpos maternos o animal recém-nascido é capaz de produzir anticorpos logo após o nascimento. Leitões privados de colostro respondem bem ao vírus da pseudorraiva com 2 dias de idade, mas se amamentados, a produção de anticorpos não começa até que tenham 42 dias de idade (WILLIAMS; 1993).

#### 3.4 PAPEL DA GLUTAMINA NA RESPOSTA AO DESAFIO SANITÁRIO.

Em ambientes de desafio sanitário, comumente encontrado em granjas comerciais, a manutenção do consumo e do ganho de peso de leitões após a desmama pode ser comprometida. Nessas condições ocorre intensa multiplicação de macrófagos e linfócitos, e a GLN tem se mostrado um importante substrato energético para estas células (ABREU; DONZELE, 2008; ANDREWS; GRIFFITHS, 2002; CALDER, 1995). Portanto, o intestino percebe o ambiente nutricional e antigênico e atua na modulação da resposta imune do indivíduo, na triagem imunológica e na defesa, assim como gera respostas endócrinas ao ambiente do lúmen (BURRIN et al., 2000).

Em relação aos linfócitos T *in vitro* os níveis de glutamina tem um papel direto na proliferação, assim como a produção de interleucina 2 (IL2) e a expressão de seus receptores (WILMORE; SHABERT, 1998). Bem como, diferenciação de linfócitos B em células de síntese e secretoras de anticorpos, *in vitro*, é dependente de GLN e aumenta significativamente com o aumento das concentrações fisiológicas deste aminoácido (CRAWFORD; COHEN, 1985).

Em condições de estresse catabólico, como a desmama ou infecções, as concentrações de GLN plasmáticas e musculares diminuem, e ocorre aumento do fornecimento de GLN do músculo para outros tecidos do corpo (CALDER; NEWSHOLME, 2002). O suprimento nutricional de glutamina pode estar limitado em virtude da desmama ou por algum estresse intestinal devido à rápida renovação e substituição das células da mucosa (BEQUETTE, 2003). O aumento da demanda de GLN durante uma situação de estresse imunológico, tanto pelos enterócitos da mucosa intestinal quanto pelas células do sistema imune, pode determinar a condição de essencialidade deste aminoácido.

Em diversos estados de estresse (sepse e trauma), o fornecimento de dietas enterais ou parenterais ricas em GLN pode reduzir a incidência de translocação de bactérias, diminuindo a aderência das bactérias ao enterócito e normalizando os níveis de IgA (SOUBA, 1993).

Hwang, O'dwyer e Smith (1987) relataram que a suplementação de soluções de GLN parenterais para pacientes humanos diminuiu significativamente a atrofia das vilosidades associada às fórmulas padrão sem GLN. No entanto, os efeitos da suplementação com GLN e glutamato são variáveis e inconsistentes sob condições normais de alimentação. Em quadros inflamatórios ou de doença com catabolismo, espera-se que a GLN e o glutamato tenham papéis mais importantes em termos de aumentar a resposta imune, de manter a integridade do intestino, de aumentar a síntese proteica e reduzir o catabolismo proteico, de reduzir a mortalidade e a morbidade, assim como o impacto geral sobre o desempenho de leitões jovens.

A afirmação de que em condições de estresse imunológico a suplementação com GLN torna-se importante, foi constatada por Yi et al. (2005), ao avaliarem o efeito da GLN e do plasma sanguíneo como aditivos para leitões desmamados submetidos a condições de desafio. A inclusão de GLN nas rações sem plasma sanguíneo atenuou a depressão do crescimento e a atrofia das vilosidades da mucosa intestinal de leitões desafiados com *E.coli* K88<sup>+</sup>, proporcionando desempenho semelhante ao dos animais que receberam plasma sanguíneo nas rações sem suplementação de GLN.

De forma semelhante, Kitt, Miller e Fischer (2003) avaliaram o efeito da inclusão de 5% de GLN nas rações sobre o desempenho de leitões desmamados desafiados com lipopolissacarídeo de *E. coli* (endotoxina de *E. coli*) ou com solução salina e constataram que a resposta à inclusão de GLN nas rações foi maior quando os animais estavam desafiados com a endotoxina. A inclusão de outros aminoácidos não essenciais na ração também foi testada neste experimento, e a baixa resposta dos animais em desempenho, quando comparados aos animais que receberam suplementação com GLN após o desafio, comprova que a suplementação com GLN é importante em animais desafiados (KIT; MILLER; FISCHER, 2003).

Gómez (1994), trabalhando com leitões neonatos alimentados com dieta líquida, também encontraram efeito positivo da inclusão de GLN sobre o ganho de peso diário dos animais desafiados com *Rotavirus enteritis*.

Os trabalhos de Kitt, Miller e Fischer (2003) e Gómez (1994) sugerem que a inclusão de GLN na dieta teria efeito em situações de desafio sanitário, e que em condições normais a síntese da GLN a partir de outros aminoácidos seria capaz de atender a necessidade do animal.

Com o intuito de esclarecer os fatores que influenciam a estrutura e função do intestino de leitões recém-desmamados, Pluske, Hapson e Williams (1997) preconizaram a

necessidade de conhecer os mecanismos que controlam a capacidade de defesa do animal nesta fase. A utilização de aminoácidos não essenciais como a GLN tem efeitos sobre a digestão, absorção e a capacidade imunológica do TGI quando este se encontra comprometido. A procura por ingredientes para as rações que possam manter o crescimento dos leitões no período pós desmama e amenizar suas inevitáveis consequências, somada à tendência da indústria suinícola de redução do uso de antibióticos nas rações, conduzem à hipótese de que a suplementação de dietas com GLN no período que sucede a desmama dos leitões, de forma isolada ou associada a outros ingredientes (plasma sanguíneo e lactose), pode ter efeito positivo sobre o desempenho dos animais.

## 4 ENDOTOXINAS

As endotoxinas são complexos de alto peso molecular associadas à membrana externa de bactérias gram-negativas, sejam elas patogênicas ou não, e se constituem na mais significativa fonte de pirógeno para a indústria farmacêutica (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Apesar da maior parte das endotoxinas permanecerem associadas à parede celular até a desintegração da bactéria, quantidade ínfimas de endotoxinas são liberadas na forma solúvel por culturas de bactérias jovens ou também por bactérias gram-negativas, dos generos *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* e outros agentes patogênicos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A denominação de lipopolissacarídeo (LPS) é aplicada à endotoxina purificada para enfatizar a sua natureza química (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

As endotoxinas são tóxicas à maioria dos mamíferos. Estudos têm demonstrado que a injeção de células de bactérias gram-negativas vivas ou mortas, ou LPS purificados, causa uma série de reações patofisiológicas que podem variar de uma leve alteração de temperatura (febre), mudanças na contagem de células brancas do sangue até coagulação intravascular disseminada, hipotensão, choque e mesmo a morte (ZIJLSTRA et al., 1997; COOPER; LEVIN; WAGNER, 1971).

O mecanismo de indução de febre envolve a interação do lipídeo A, com macrófagos e a produção de IL-1 que atravessa a barreira hematoencefálica e altera o ponto de equilíbrio dos neurônios reguladores de temperatura do hipotálamo anterior. Um significativo aumento na concentração de prostaglandina E<sub>2</sub> e adenosina monofosfato cíclica (cAMP) foi encontrado no fluido cérebro-espinhal de coelhos, nos quais foi induzida febre por injeção intravenosa de lipídeo A, indicando que ambos ocupam papel importante na indução de febre (PEARSON, 1985).

## 5 RESPOSTA IMUNE CONTRA LIPOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS (LPS)

A fim de verificar a influência de certos fatores no processo inflamatório, diversos trabalhos (YI et al., 2005; GAINES et al., 2003; CARROL et al., 2003) foram realizados administrando LPS. Quando inoculados, os LPS são transferidos por uma proteína ligante de LPS a outra proteína (CD14) presente na superfície dos macrófagos, gera um sinal e se liga aos receptores glicoproteicos tipo toll (TLR-4) encontrados na superfície de bactérias Gram-negativas, responsável pela ligação aos LPS. Essa ligação ativa os macrófagos e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), fazendo com que os LPS se dissociem do CD14 e se liguem a lipoproteínas, perdendo a toxicidade (TIZARD, 2009). O nível dessas citocinas na circulação sanguínea pode ser usado como biomarcador de processos inflamatórios (SHERWIN et al., 2008; BOZZA et al., 2007).

A inoculação de LPS induz sintomas de infecção bacteriana aguda nos leitões com consequente depressão, anorexia e febre (LIU et al., 2008). Em trabalho com leitões realizado por Ribeiro et al. (2010), a administração de 150  $\mu$ g de LPS/kg de peso vivo aumentou a temperatura corporal e a frequência respiratória, causou vômitos, diarréias, intensa prostração e até mesmo a morte de 3 dos 15 animais inoculados. Em suínos (LIU et al. 2003, 2008 ; JOHSON, 1997; VAN HEUGTEN; SPEARS; COFFEY , 1994;), camundongos (MILLER et al ., 1994), ratos e frangos ( COOK et al ., 1993, TAKAHASHI et al ., 1998, 1999, 2002) foi observada queda no desempenho zootécnico como consequência da redução do consumo alimentar e efeitos catabólicos causados pela estimulação do sistema imune com LPS.

A administração de LPS resulta também em uma variedade de alterações morfológicas diretas no trato digestório, além do efeito indireto em consequência da redução no consumo alimentar. Em leitões, excluindo-se a influência de consumos alimentares distintos, já foi observado que o LPS, mesmo quando administrado pela via intraperitoneal, diminui a altura dos vilos intestinais e aumenta a profundidade de criptas intestinais (HOU et al., 2010; LIU et al., 2008), além de aumentar os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 (LIU et al., 2008).

## 6 DIARRÉIAS PÓS-DESMAME

Segundo Jonsson e Conway (1992), as principais causas do aparecimento de diarreia pós-desmame em leitões são: súbita privação de anticorpos maternos e de outros fatores de proteção presentes no leite da porca; alteração da dieta; os extremos de temperatura e umidade e estresses dietéticos e social. Qualquer um destes fatores pode aumentar a susceptibilidade à infecção e, se combinados, aumenta o risco de infecção. A diarreia pós-desmame pode ser de origem osmótica, como resultado do consumo excessivo de ração quando as funções digestivas e absorptivas não estão completamente desenvolvidas, ou ser resultado da ação de enterotoxinas produzidas por algumas cepas de *E. coli*, *Staphylococcus* e *Clostridium* (HAMPSON, 1986).

A *E. coli* é uma enterobactéria envolvida em uma grande variedade de infecções em muitas espécies animais, atuando como agente primário ou secundário. A bactéria pode exercer seu efeito patogênico no intestino delgado dos animais, sendo que dois mecanismos de virulência são fundamentais: a aderência (mediada por fimbrias) e a capacidade de produzir toxinas (BARCELLOS; SOBESTIANSKY; PIFFER, 1998). As enterotoxinas produzidas pela *E. coli* ligam-se aos receptores do epitélio intestinal e iniciam reações intracelulares, levando à diarreia secretora grave, especialmente durante os primeiros cinco a 10 dias após o desmame (HAMPSON, PLUSKE e PETHICK, 2001).

Hampson, Hinton e Kidder (1985) e Nabuurs, Zijderveld e De Leeuw (1993) relataram que *E. coli* geralmente é detectada em leitões com diarreia e também em fezes de leitões saudáveis. Miller (1984) concluiu que a presença de *E. coli* no intestino delgado de leitões não desmamados, sem evidente aparecimento nas fezes, é indício de que estes organismos podem estar presentes em pequeno número no trato intestinal de animais saudáveis. Entretanto, após a desmama, certos animais dentro de um grupo apresentam maior proliferação de *E. coli* e desenvolvem diarreia pós-desmame.

Segundo Borowski (1995), o controle da diarreia pós-desmame é difícil e se baseia em correções ambientais, de manejo, de nutrição e de estimulação imunitária. Como em alguns casos essas medidas se mostram insuficientes, indica-se como medida complementar a antibioticoterapia.

Estudos de prevalência de enteropatógenos em leitões recém-desmamados com diarreia demonstraram que a população de *Escherichia coli* é o agente bacteriano mais isolado nos animais em fase de creche no Brasil (MENIN et al., 2008). No Brasil, estima-se que a média de leitões nascidos vivos e que morrem antes do desmame esteja em torno de

12,5 a 15 %, atribuindo-se a diarreia uma das principais causas de morbidade e mortalidade de leitões nesta fase da vida. (ABRAHÃO et al., 2004).

De acordo com Kummer et al. (2009), alguns fatores podem influenciar o desempenho produtivo de suínos como o desenvolvimento genético, o manejo sanitário, a nutrição, o ambiente e a interferência do homem. No entanto, cuidados na fase de creche, dos 21 aos 63 dias de vida, são fundamentais para obter melhor desempenho do animal. Fatores como a idade ao desmame, a qualidade do leitão e a variação de peso dentro do mesmo lote devem ser consideradas, pois uma menor idade ao desmame resulta em aumento no número de leitões terminados por ano, porém influenciam em um maior desafio sanitário e variação de peso dentro do mesmo lote.

## REFÊRENCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular immunology**, 6<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Co., 2007. p. 566.
- ABRAHÃO, A.A.F. et al. Causas de mortalidade de leitões neonatos em sistema intensivo de produção de suínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Pirassununga, v. 41, p. 86-91, 2004.
- ABREU, L.M.T.; DONZELE, J.L. **Aminogut**: ciência e prática na nutrição de leitão: Glutamina na Nutrição de leitões, 2007. Disponível em: <[http://www.lisina.com.br/upload/ajinomoto\\_br.pdf](http://www.lisina.com.br/upload/ajinomoto_br.pdf)>. Acesso em: 28 dez. 2011.
- ABREU, L.M.T.; DONZELE, J.L. Glutamina na nutrição de leitões. **Anais do V Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos – CBNA**. Cascavel, PR, p. 75-80, 2008.
- ALLEE, G. L.; TOUCHETTE, K. J. Efectos de la nutrición sobre la salud intestinal y el crecimiento de los lechones. In: Curso de Especialización, 15. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. **Anais ...** Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (FEDNA), Madrid. p.127-143. 1999.
- ANDREWS, F.J.; GRIFFITHS, R.D. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. **British Journal of Nutrition**. v. 87, supl. 1, p. 53-58, 2002.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I.A. Utilização de vacinas. In: **Suinocultura Intensiva**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 239-253.
- BEQUETTE, B.J. Amino acid metabolism in animals: an overview. In: D'MELLO, J.P.F. **Amino Acids in Animal Nutrition**, 2. ed. p. 87-102, 2003.
- BLIKSLAGER, A.T. et al. Glutamine and transforming growth factor – alpha stimulate extracellular regulated protein kinase and enhance recovery of villous surface area in porcine ischemic-injured intestine. **Surgery**, v. 125, p. 186-194, 1999.
- BOROWSKI, S. M. Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *E. coli* isoladas de suínos apresentando diarreia no período pós-desmame. **Arquivos de Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 25, p. 431-435, 1995.
- BOZZA, F.A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical Care**, v.11, p. 49-56, 2007.
- BROWN, D.C. et al. The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p.187-198. 2006.
- BURRIN, D.G. et al. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal pigs: how is enough?. **American Journal of Clinical Nutrition**, Stanford, v. 71, p. 1603-1610, 2000.

- BUTLER, J.E. et al. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 6822-6830, 2002.
- CALDER, P.C. Fuel utilization by cell of the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, p.65-82, 1995.
- CALDER, P.C.; NEWSHOLME, P. Glutamine and the Immune System, In: P.C. CALDER C.J. FIELD; H.S. GILL. **Nutrition and Immune Function**, Guildford, 2002, p. 109-133.
- CARROL, J.A. et al. Effect of menhaden fish oil supplementation and lipopolysaccharide exposure on nursery pigs I. Effects on the immune axis when fed diets containing spray-dried plasma. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 24, p. 341-351, 2003.
- COOK, M.E. et al. Immune modulating by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-induced growth depression. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1301-1305, 1993.
- COOPER, J. F.; LEVIN, J.; WAGNER JR, H.N. Quantitative Comparison of in vitro and in vivo Methods for the Detection of Endotoxin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 78, p. 138-145, 1971.
- CRAWFORD, J.; COHEN, H.J. The essential role of glutamine in lymphocyte differentiation in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 24, p. 275–282, 1985.
- CURTHOYS, N.P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, p. 133-159, 1995.
- CYNOBER, L.A. Glutamine metabolism in stressed patients. In: **6<sup>th</sup> Proceedings of international congress on amino acids**. Bonn. p.5. 1999.
- DARMAUN, D.; HUMBERT, B. Does the fate of enterally administered glutamine depend on its molecular form? Bound versus free amino acid. **Nutrition**, v. 16, p.1101-1102, 2000.
- ELLIOTT, D. **Parenteral nutrition**. Scientific Proceedings of the WSAVA; 2004; HVMS World Congress, 2004. Rhodes, Greece.
- ELLIOTT, D.A.; BIOURGE, V. **Critical care nutrition**. Waltham focus, v.16, n.3, p.31-36, 2006. Disponível em: <[http://www.ivis.org/journals/vetfocus/16\\_3/en/5.pdf](http://www.ivis.org/journals/vetfocus/16_3/en/5.pdf)> Acesso em: 03 out 2012. 2006.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5. ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1, p. 161-168, 2004.
- FIELD, C.J. et al. Lower proportion of CD45R0+ cells and deficient interleukin-10 production by formula-fed infants, compared with human-fed, is corrected with supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.31, p. 291–299, 2000.
- FISCHER DA SILVA, A.V.F. **Efeito da restrição alimentar precoce e da glutamina no desempenho e na mucosa intestinal em frangos**. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

FREIRE, J.P.B.. Maneio alimentar dos leitões: Adaptação digestiva ao regime de desmame. 1as Jornadas Internacionais de Suinocultura, U.T.A.D., Vila Real, 111-119,1998.

GAINES, A.M. et al. Effect of menhaden fish oil supplementation and lipopolysaccharide exposure on nursery pigs II. Effects on the immune axis when fed simple or complex diets containing no spray-dried plasma. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 24, p. 353-365, 2003.

GATNAU, R.; MATEOS, G. G.; LÁZARO, R. Utilización de proteínas plasmáticas de origen porcino em dietas para lechones. In: **Curso de especialización**, 11. Avances en nutrición y alimentación animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Madrid, p.170-187. 1995.

GÓMEZ, G.G. **Glutamine supplemented for unstressed and stressed** (Rotavirus enteritis) neonatal piglets, 1994. Disponível em [http://cals.ncsu.edu/an\\_sci/ann\\_rep94/gggom93.html](http://cals.ncsu.edu/an_sci/ann_rep94/gggom93.html), acessado em 02/01/2012.

HAMPSON, D.J.; HINTON, M.; KIDDER, D.E. Coliform numbers in the stomach and small intestine de healthy pigs following at three weeks of age. **Journal Comparative Pathology**. v. 95, p. 353-362, 1985.

HAMPSON, D.J. Attempts to modify changes in the piglets small intestine after weaning. **Research in Veterinary Science**, v. 40, p. 313-317, 1986.

HAMPSON, D. J.; PLUSKE, J. R.; PETHICK, D. W. In: Proceedings of the VIII **International Symposium on Digestive Physiology**. New York: CABI Publishing, 2001. p. 247-261.

HOSKINSON, C.D.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in the piglets. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 2471-2478, 1990.

HOU, Y. et al. Dietary a-ketoglutarate supplementation ameliorates intestinal injury in lipopolysaccharide- challenged piglets. **Journal of Amino Acids**, London, n. 39, p.555-564, 2010.

HOUSE, J.D.; PENCHARZ, P.B.; BALL, R.O. Glutamine supplementation to total parenteral nutrition promatial extracellular fluid expansion in piglets. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.396-404, 1994.

HWANG, T.L.; O'DWYER, S.T.; SMITH, R.J. Preservation of small bowel mucosa using glutamine – enriched parenteral nutrition. **Surgery Forum**. Chicago, v. 38, p. 56, 1987.

JOHNSON, R.W. Inhibition of growth by proinflammatory cytokines: an intergrated view. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1244-1255, 1997.

JONSSON, E.; CONWAY, P. Probiotic for pigs. In: FULLER, R (Ed.). **Probiotics – The Scientific Basis**. London, Chapman e Hall, 1992 p. 259-316.

KELLY, D.; COUTTS, A.G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**, v.66, p.161-167, 2000.

- KITT, S.J. et al. Effects of diet and crystalline glutamine supplementation of growth performance and small intestine morphology of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.79, supl,1, p.322 (Abstract), 2001.
- KITT, S.J.; MILLER, P.S.; FISCHER, R.L. Effects of glutamine on growth performance and intestinal development of immune challenged weaning pigs fed chemically defined diets. **Nebraska Swine Report**, v. 61, p. 34-38, 2003.
- KUMMER, R. et al. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, p. 195-209, 2009.
- LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Review**, v.48, p.297-309, 1990.
- LACKEYRAM, D.; YUE, X.; FAN, M.Z. Effects dietary supplementation of crystalline L-glutamine on the gastrointestinal tract and whole body growth in early-weaned piglets fed corn and soybean meal – based diets. **Journal Animal Science**, v.79, p.230-231, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica**, traduzido por SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. 2ª ed. São Paulo: SARVIER, 1995. p. 839.
- LIU, Y.; BAIDOO, S. K. Exogenous enzymes for pig diets: an overview. In: **Enzymes in poultry and swine nutrition**. 1997. Disponível em: <[http://web.idrc.ca/en/ev-30967-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://web.idrc.ca/en/ev-30967-201-1-DO_TOPIC.html)>. Acesso em: 24 jun. 2012.
- LIU, Y.L. et al. Effects of fish oil supplementation on the performance and the immunological, adrenal, and somatotropic responses of weaned pigs after an *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2758-2765, 2003.
- LIU, Y. L. et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. **British Journal of Nutrition**. v. 100, p.552-560, 2008.
- McCAULEY, I.; HARTMANN, P.E. Changes in piglets leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. **Research in Veterinary Science**, v.37, p.234-241, 1984.
- MEDEL, P.; LATORRE, M. A.; MATEOS, G. G. Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente. In: Curso de Especialización, **Avances en nutrición y alimentación animal**. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid (FEDNA), 1999. p.147-195.
- MENIN, A. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural** v. 38, n. 6, p. 1678-1679, 2008.
- MILLER, B.G. et al. Influence of diet on post weaning malabsorption and diarrhoea in the pig. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.187-193, 1984.
- MILLER, C.C. et al. Feeding conjugated linoleic acid to animal partially overcomes catabolic responses due to endotoxina injection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, p. 1107- 1112, 1994.

MOESER, A.J. et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v.292, p. 173–181, 2007.

MOREIN, B., ABUSUGRA, I., BLOMQUIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.87 , p. 207-213, 2002.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, , 2010. 611 p.

NABUURS, M.J.S.; ZIJDERVELD, F.G.; DE LEEUW, P.W. Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhea in pigs at weaning. **Research in veterinary Science**, v. 55, p.70-77, 1993.

OLIN, M. R . et al. Lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Viral Immunology**,v. 18, p. 490–499. 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Série Imunologia Básica param Imunizações**. Imunologia Geral. Genebra (Suíça); 1993.

PADOVESE, R. Aplicações clinicas da glutamina. **Revista Brasileira de Ciência Farmacologica**, v. 36, p. 23-25, 2000.

PALANCH, A.C. Metabolismo da glutamina no intestino. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Sprint, 2000 p. 85-96.

PEARSON, F. C. Pyrogens, endotoxins LAL Testing and Depyrogenation. In:DEKKER, M: **Endotoxins**. 2. vol. New York, NY, 1985, p. 89-214.

PIÉ, S., et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **Journal of Nutrition**. v. 134, p. 641–647, 2004.

PIERZYNOWSKY, S.G., et al. Glutamine in gut metabolism. In: Piva, A., Knudsen, K.E.B., Lindberg, J.E. **Gut environment of pigs**. University Press. Nottingham. 2001, p. 43-62.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed., São Paulo: Atheneu , p. 179-215, 2003.

PIVA, A.; BACH KNUDSEN K.E.; LINDBERG J.E Glutamine in gut metabolism. In: **Gut environment of pigs**. Nottingham University Press, 2001, p. 43-62.

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

POMPÉIA, C. Glutaminase (E.C.3.5.1.2) ou L-glutamina amido-hidrolase. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Sprint, 2000, p.17-64.

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

RHOADS, J.M. et al. L- glutamine stimulate intestinal cell proliferation and activates motogen – activated protein kinase. **American Journal of Physiology**, v.272, p. 943-953, 1997.

RIBEIRO, A.M.L. et al. Níveis de  $\beta$ -glucanos em dietas de leitões na fase inicial. In: 47<sup>a</sup> **REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, Salvador, Bahia, 2010. p. 54-60.

ROSTAGNO, H.S.; PUPA, J.M. Fisiologia da digestão e alimentação de leitões. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E MANEJO DE LEITÕES, 1998, Campinas. **Anais ...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1998. P. 60-87.

SANTIN, E. Interação entre sistema imunológico do suíno e micotoxicose. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUÍNA, Águas de Lindóia. **Anais...**, Águas de Lindóia: CONSUITEC, 2007. p.22-27.

SANTOS R.V.T.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA L.F.B.P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sciences**, v. 80, p.573-578, 2007.

SHABERT, J.; EHRLICH, N. **The Ultimate Nutrient Glutamine**. New York: Paragon Press, Honesdale; 1994.

SHERWIN, C. et al. Utility of interleukin- 12 and interleukin- 10 in comparison with other cytokines and acute-phases reactants in the diagnosis of neonatal sepsis. **American Journal of Perinatology**, v. 25, p. 629-636, 2008

SILVA, L.P.; NORNBORG, J.L. Prebiótico na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, p. 983-990, 2003.

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, Supl., p. 40S-44S, 1990.

SOUBA, W. W.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **Journal of Parenteral Enteric Nutrition**, v.9, p.608-617, 1985.

SOUBA, W.W. et al. Gut glutamine metabolism. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, Supl., p.45-50, 1990.

SOUBA, W.W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 2-9, 1993.

STOLL, B.; HENRY, J.; REEDS, P.J. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 606-614, 1998.

STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução. Joao Paulo de Campos. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114p.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**: Uma introdução. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009, p. 587.

TAKAHASHI, K. et al. Changes in plasma a 1-acid glycoprotein concentration and selected immune response in broiler chickens injected with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **British Poultry Science**, v. 39, p. 152-155, 1998.

TAKAHASHI, K.; ONODERA, K.; AKIBA, Y. Effect of dietary xylitol on growth and inflammatory responses in immune stimulated chickens. **British Poultry Science**, v. 40, p. 546-548, 1999.

TAKAHASHI, K. et al. Influence of dietary conjugated linoleic acid isomers on early inflammatory responses in male broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 43, p. 47-53, 2002.

TLASKALOVA – HOGENOVA, H. et al. Development of immune responses in early pig ontogeny. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 43, p. 135-142, 1994.

VAN HEUGTEN, E.; SPEARS, J.W.; COFFEY, T.; The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2661-2669, 1994.

VARLEY, M. MILLER, B. Gut Health and immunity in young pigs. In: **Recent advances in animal nutrition**. Ed. P.C. Garnsworthy, J. Wiseman. Nottingham University Press, p.195-209, 2002.

VASCONCELOS, M.I.L.; TIRAPEGUI, J. Importância nutricional da glutamina. **Arquivo Gastroenterologia**, v.35, p. 207-215, 1998.

WANG, J.Y.; LI, J.; PATEL, A.R. Synergistic induction of ornithine decarboxylase by asparagine and gut peptides in intestinal crypt cell. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 1476-1484, 1998.

WATFORD, M., et al. Hepatic glutamine metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 301-303, 2002.

WEARY, D. M.; JASPERS, J.; HÖTZEL, M. J. Understanding weaning distress. **Applied Animal Behaviour Science**, v.110, p. 24-41, 2008

WILLIAMS, P.P. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal calostrual leukocytes by neonatal pigs, **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 1-8, 1993.

WILMORE, D.W.; SHABERT, J.K.; The role of glutamine in immunologic responses. **Nutrition**, v. 14, p. 618–626,1998.

WRAY, C.J.; MAMMEN, J.M.V.; HASSELGREN, P. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, v.18, p.971-97, 2002.

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

WU, G.; MORRIS, S.M. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. **Biochemistry Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

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

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

ZIEGLER, T.R. et al. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosa repair, and barrier function. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p. 229-261, 2003.

ZIJLSTRA, S. et al. Validation of the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test for Routine PET Radiopharmaceuticals. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 48, p. 51- 54, 1997.

## 7 OBJETIVOS

### 7.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência da suplementação dietética de diferentes níveis de glutamina dietética às rações, sobre o desempenho, hematologia, imunologia e ambiência de leitões desafiados com o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na fase de creche.

### 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos e possíveis interações dos teores de glutamina e o tipo de alojamento de leitões na fase de creche.
- Avaliar a eficiência nutricional da glutamina em leitões desmamados submetidos a desafio com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*;
- Avaliar o perfil hematológico e de frequência de diarreias de leitões submetidos a dietas com glutamina.
- Avaliar a influência de dois tipos de instalação nos índices zootécnicos de leitões desafiados com LPS e suplementados com glutamina na dieta.
- Determinar o teor de glutamina que apresenta melhor comportamento para atenuar os níveis de cortisol produzidos pelo desafio com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

## 8 ARTIGO 1:

### **EFEITO DA GLUTAMINA E DO LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI* NO DESEMPENHO DE LEITÕES DESMAMADOS E ALOJADOS EM DOIS TIPOS DE CRECHE.**

**Resumo:** O presente experimento foi conduzido com o objetivo avaliar a ação da glutamina dietética sobre o desempenho e a incidência diarreia em leitões na fase de creche, submetidos a duas condições de alojamento e desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*). Foram utilizados 48 leitões de genética Agroceres x Penarlan, desmamados aos  $21 \pm 2$  dias de idade, com peso médio inicial de  $6,17 \pm 0,783$  kg. Os tratamentos corresponderam a valor quatro níveis de glutamina (0, 1.0, 1.5, 2.0 %) e duas condições de alojamento (Creche I, com menos fatores de risco; e Creche II, com mais fatores de risco), definindo um desenho experimental em modelo fatorial 4 x 2. Os animais foram alojados em número de 2 por baia, sendo um macho castrado e uma fêmea, durante 30 dias. Houve interação dos fatores para a conversão alimentar, onde para os animais da Creche I níveis crescentes de glutamina dietética promoveram melhora da conversão alimentar. Para o fator alojamento, os animais da Creche I apresentaram melhor ( $P \leq 0,05$ ) ganho diário de peso, consumo diário de ração e peso final, e menor incidência e intensidade de diarreia. A glutamina demonstrou ser benéfica para a conversão alimentar, quando as condições de ambiente apresentaram baixos fatores de risco; e a condição ambiental com baixos desafios sobrepõe a ação da glutamina para características de ganho de peso e consumo de ração.

**Palavras-chave:** Desafio. Desempenho. Diarreia. Intestino delgado.

### **GLUTAMINE AND LPS (*ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE) EFFECTS ON WEANING PIGLETS PERFORMANCE ALLOCATED IN TWO DIFFERENT NURSERY.**

**Abstract:** This experiment was conducted to evaluate the action of diet glutamine over the performance and incidence of diarrhea in piglets in the nursery phase, subject to two conditions for accommodation and challenged with LPS (*Escherichia coli* lipopolysaccharide). There was used 48 piglets (Agroceres x Penarlan), weaned of age  $21 \pm 2$  days, with initial weight of  $6,17 \pm 0,759$ kg. The treatments were four levels of glutamine (0, 1.0, 1.5, 2.0%) and two housing conditions (Nursery I, with low risk factors level and Nursery II, with high risk factors level) setting a 4x2 factorial experimental design. The animals were allocated two per cage, one barrow and one female, were evaluated during 30 days. There was an interaction for feed conversion ratio with an improvement when the levels of glutamine were increased for the Nursery I animals. For the housing factor, animals allocated at Nursery I had better ( $P \leq 0.05$ ) average daily gain, daily feed intake and final weight, and lower incidence and severity of diarrhea. The glutamine had better feed conversion ratio, when the ambient conditions presented lower risk factors; and the ambient conditions with low challenge overrides the actions of glutamine to average gain and feed intake.

**Keywords:** Challenge. Diarrhea. Performance. Small intestine.

## 8.1 INTRODUÇÃO

Na suinocultura industrial o êxito do desmame precoce deve-se à qualidade das rações que fazem uso de ingredientes complexos e de alta digestibilidade, ao uso de aditivos melhoradores do *status* sanitário e fisiológico intestinal e da interação de adequadas ações de manejo e de ambiente. Não obstante sejam observados índices produtivos aceitáveis na fase, existe ainda certo consenso de que a taxa de crescimento é limitada devido à baixa ingestão de alimento, principalmente nas primeiras duas semanas pós-desmame (PIERCE et al., 2005; DONZELE; ABREU; HANNAS, 2002; VAN DIJK et al., 2002; PLUSKE, 2001; BERTOL; SANTOS FILHO; LUDKE, 2000).

Neste cenário alguns fatores de risco de caráter ambiental e de manejo exercem grande influência sobre o desempenho dos animais, como a idade média e o peso médio ao desmame, o ganho de peso médio do desmame até 21 dias, a homogeneidade do peso dos leitões aos 21 dias após o desmame (coeficiente de variação) e a ocorrência de diarreia (SILVA et al., 1999; MORES et al., 1993, 1998).

As respostas à presença destes fatores se traduzem na piora do desempenho, no aumento da desuniformidade do lote, na maior incidência de diarreia e no aumento da taxa de mortalidade. A diarreia é a principal enfermidade associada aos fatores de risco ligados ao ambiente e ao manejo na fase de creche, sendo decorrente principalmente da proliferação da *Escherichia coli* enterotoxigênica (MACHADO, 2007; HOPWOOD; PLUSKE; HAMPSON, 2005).

Considerando que a associação do baixo consumo alimentar com os distúrbios digestivos ainda é uma ocorrência comum nessa fase, com repercussões negativas na funcionalidade intestinal, pesquisas continuam sendo dirigidas para buscar recursos que possam minimizar estes danos (JUNQUEIRA et al., 2008). Neste contexto, alguns componentes veiculados nas rações têm demonstrado uma ação muito positiva na preservação/recuperação do epitélio intestinal, como é o caso da glutamina (HAYNES et al., 2009).

Apesar de ser considerado o aminoácido mais abundante no plasma e no tecido muscular (LI et al., 2007), a síntese de glutamina pode não ser suficiente para corresponder ao aumento da absorção e do metabolismo do trato gastrointestinal, bem como na demanda do sistema imunológico em algumas situações adversas, como no caso de enfermidades, sendo assim classificado como um aminoácido condicionalmente essencial (ELLIOTT; BIOURGE, 2006). Devido aos inúmeros processos metabólicos que a glutamina

participa e ao seu papel na recuperação de animais doentes ou que passaram por situação de estresse, pesquisas têm se intensificado no intuito de estabelecer a glutamina como um aminoácido condicionalmente essencial a saúde (LOPES, 2005).

Reconhecendo a importância do meio ambiente e o papel da glutamina nas funções da sustentação imune e de recuperação intestinal no pós-desmame, objetivou-se com este trabalho foi avaliar a ação de diferentes níveis de glutamina dietética na ração de leitões desmamados submetidos a duas condições de alojamento e desafiados com LPS (Lipopolisacarídeo de *Escherichia coli*), na promoção do desempenho e na preservação da saúde na fase pós desmame.

## 8.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizados 48 leitões da linhagem Agroceres x PenArLan, sendo 24 machos castrados e 24 fêmeas, desmamados em média aos  $21 \pm 2$  dias de idade, com peso médio inicial de  $6,16 \pm 0,783$  kg durante 30 dias.

Os animais foram submetidos a quatro dietas isonutrientes, com diferentes inclusões de L-glutamina (0; 1,0; 1,5 e 2,0%), alojados em dois tipos de instalação (Creche I e Creche II), sendo dois animais por baia (um macho castrado e uma fêmea). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizados em esquema fatorial 4x2 (sendo quatro níveis de glutamina e dois tipos de alojamento), com três repetições, sendo cada baia considerada uma repetição.

A instalação denominada Creche I caracterizou-se por possuir 12 baias metálicas, distribuídas em duas linhas, suspensas a 0,65 m do chão, possuindo cada baia 1,43 m<sup>2</sup> de área (1,00 x 1,43 m), provida de piso plástico ripado e com paredes vazadas em ferro. Possuíam ainda comedouro tipo calha (0,73 m lineares com cinco bocas de 0,14 m cada), bebedouro tipo chupeta com altura regulável e com vazão de 0,950 L/min e aquecimento complementar proporcionado por lâmpadas infravermelhas de 250 W penduradas a 0,50 m do piso. O controle térmico da instalação foi feito também pelo manejo de cortinas, dispostas bilateralmente, com dimensões de 1,14 x 12,0 m.

O segundo tipo de instalação, definida como Creche II, possuía 12 baias de alvenaria, distribuídas em duas linhas, com 2,97 m<sup>2</sup> de área cada (1,93 x 1,54 m), separadas por paredes com altura de 0,80 m. O piso das baias era de cimento, sendo 1/3 da área coberta com cama sobreposta de maravalha. A limpeza do piso foi realizada diariamente, uma vez ao

dia. Nas duas primeiras semanas do período experimental foram utilizados comedouros de madeira (0,30 x 0,09 m) que, posteriormente, foram substituídos por comedouros metálicos semi-automáticos (0,71 x 0,30 x 0,28 m de comprimento, altura e profundidade da boca, respectivamente). Os bebedouros eram do tipo chupeta com vazão de 1,8 L/min. A ventilação no interior do galpão foi realizada de forma natural através do manejo de cortinas, instaladas bilateralmente, apresentando as seguintes medidas 1,61 x 18,48 m. O aquecimento das baias foi realizado por lâmpadas infravermelhas de 250 W penduradas a 0,50 m do piso.

Durante o período experimental, com duração de 30 dias, os animais receberam água e ração à vontade. As rações experimentais foram formuladas para atender ou exceder as exigências de suínos na fase pré-inicial (21 - 35 dias de idade) e inicial (36 - 50 dias de idade) (ROSTAGNO et al., 2011) e suas composições centesimais e nutricionais calculadas encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Independente do nível de glutamina utilizado nas rações e do modelo de alojamento empregado, todos os leitões foram desafiados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). O programa de desafio imunológico foi realizado do 22º ao 26º dia do período experimental. Os animais receberam uma dose diária de 0,3 µg de LPS (sorotipo 0111:B4, Sigma Aldrich®), diluído em 5 mL de leite integral, por via oral, através de gavagem, entre as 7:30 e 8:00 horas (PARRA-SUESCUM et al., 2013).

Para a identificação dos possíveis efeitos das diferentes instalações nos resultados, foi aplicado o protocolo descrito por Morés et al. (1993); Morés et al. (1998) e Dalla Costa et al., (2000). As variáveis avaliadas no protocolo foram: ocorrência de diarreia (OD), ganho diário de peso (GDP), homogeneidade do peso dos leitões aos 21 dias após o desmame (coeficiente de variação), comprimento do comedouro por leitões (CC), tipo e altura do bebedouro (AB) e vazão máxima dos bebedouros (VB) (Tabela 3).

A avaliação da ocorrência de diarreia foi realizada pela observação diária dos leitões. A presença de um animal com diarreia determinou a definição da baia como positiva e o número de dias como o grau de acometimento, que, por sua vez, obedeceu a seguinte ordem: 0 = sem diarreia (0 dias); 1 = pouca diarreia (1 a 3 dias); 2 = muita diarreia (4 ou mais dias) (MADEC; JOSSE; CHANTAL, 1982; VIEIRA; VIEIRA; MADEC, 1989).

Semanalmente foram mensurados o consumo de ração e o ganho de peso dos animais. Os dados obtidos foram utilizados para estimar o consumo diário de ração, o ganho diário de peso e a conversão alimentar.

**Tabela 1** – Composição centesimal e calculada da ração basal experimental.

<b>Ingredientes %</b>	<b>Pré-inicial (21-35 dias de idade)</b>	<b>Inicial (36-50 dias de idade)</b>
Milho	53,25	67,77
Soja Farelo 45%	23,73	20,88
Leite desnatado em pó	10,00	4,00
Óleo de Soja	3,79	0,23
Açúcar	3,00	2,00
Leite soro em pó	2,00	2,00
Fosfato Bicálcico	1,66	1,36
Calcário Calcítico	0,64	0,70
L – Lisina HCL	0,63	0,33
Sal Comum	0,51	0,36
L- Treonina	0,29	0,09
DL- Metionina	0,24	0,05
Vitini- Sui <sup>1</sup>	0,20	0,20
L- Triptofano	0,05	0,01
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Valores Calculados</b>		
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	3,400	3,230
Proteína (%)	20,00	17,35
Acido Glutâmico (%)	2,91	2,91
Arginina (%)	0,97	0,96
Cálcio (%)	0,85	0,72
Fósforo Disponível (%)	0,50	0,39
Lisina Digestível (%)	1,45	1,02
Metionina Digestível (%)	0,55	0,32
Metionina + Cistina Digestível (%)	0,81	0,57

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico-mineral, composição por kg do produto: Vit A, 1.800.000 UI; Vit D3, 360.000 UI; Vit E, 4.000 UI; Vit K3, 600 mg; Vit B1, 280 mg; Vit B6, 300 mg; Vit B12, 3.600 mcg; Niacina, 6.000 mg; Ac. Pantotênico, 3.200 mg; Biotina, 20 mg; Ac. Fólico, 80 mg; Colina, 31g; Ferro, 20.000 mg; Cobre, 50.000 mg; Cobalto, 120 mg; Manganês, 11.000 mg; Zinco, 18.000 mg; Selênio, 60 mg; Iodo, 200 mg; Lisina, 140 g; Antioxidante, 20 g; Veículo q.s.p, 1000 g.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade, aditividade e homocedasticidade e posteriormente submetidos à análise de variância e regressão utilizando-se o pacote ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2011) do programa estatístico R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Para a avaliação da incidência e intensidade de diarreia foi aplicado o teste de Qui-quadrado.

### 8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na caracterização dos ambientes, a Creche I apresentou menos fatores de risco, fato sustentado pelos melhores resultados observados para o ganho diário de peso dos

leitões entre o desmame e os 21 dias pós-desmame e para o coeficiente de variação do peso dos leitões aos 21 dias após o desmame (Tabela 2).

**Tabela 2** –Relação das variáveis objetivas analisadas com os respectivos valores para avaliar os leitões na fase de creche e resultados obtidos nas creches estudadas.

Variáveis	Classes				
	Boa	Intermediária	Ruim	Creche I Piso ripado	Creche II Piso de concreto
Ganho de peso médio diário dos leitões nos 21 dias após o desmame (g)	>280	200 a 280	< 200	228	160
Homogeneidade do peso dos leitões 21 dias após o desmame (Coeficiente de variação)	< 19%	19 a 22%	>22%	13,39	18,56
Comprimento do comedouro por leitões (cm)	> 11	7 a 11	<7	14	15
Altura dos bebedouros (cm)	25 a 35	-----	< 25 e > 35	Regulável	37,5
Vazão máxima dos bebedouros (litros/minutos)	1,0	-----	>1,0	0,950	1,8

Considerando o fator instalação, os animais alojados na Creche I, apresentaram maior ( $P<0,05$ ) ganho diário de peso, consumo diário de ração e peso final (Tabela 3).

Whittemore e Green (2001) afirmaram que leitões na fase pós-desmama criados em condições de ambiência favoráveis (nutrição, sanidade, manejo e temperatura) podem ganhar 100, 200 e 400 g/dia na primeira, segunda e terceira semana após o desmame, respectivamente. Contudo, pode-se admitir que não seja fácil superar estes índices em condições comerciais devido à diversidade de desafios que os leitões enfrentam. O maior consumo de ração dos animais alojados na Creche I (Tabela 3), associado aos menores fatores

de risco observados nessa instalação (Tabela 2) podem justificar o maior ganho de peso observado para os animais alojados na Creche I.

**Tabela 3** –Médias do desempenho de leitões desmamados e desafiados com LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*), suplementados com diferentes teores de glutamina em dois tipos de creche.

	Creche	Teores de Glutamina (%)				Média	CV(%)
		0	1,0	1,5	2,0		
GDP (kg)	CI	0,20	0,26	0,27	0,22	0,23 <sup>a</sup>	31,87
	CII	0,17	0,15	0,18	0,16	0,16 <sup>b</sup>	19,87
CDR (kg)	CI	0,38	0,40	0,41	0,31	0,37 <sup>a</sup>	27,44
	CII	0,32	0,30	0,33	0,29	0,31 <sup>b</sup>	14,72
CA	CI	2,24	1,61 <sup>b</sup>	1,59	1,42 <sup>b</sup>	1,72 <sup>1</sup>	26,03
	CII	1,89	2,25 <sup>a</sup>	1,88	2,01 <sup>a</sup>	2,01	12,72
PF (kg)	CI	11,39	13,41	13,46	12,07	12,58 <sup>a</sup>	20,65
	CII	11,12	10,54	11,52	10,23	10,85 <sup>b</sup>	9,67

CI: instalação com piso ripado; CII: instalação com piso de concreto; GDP=ganho diário de peso; CDR= consumo diário de ração; CA= conversão alimentar; PF= peso final; CV= Coeficiente de variação. Médias seguidas de letras minúscula na coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) <sup>1</sup>  $\hat{Y} = 2,1727 - 0,4017x$  ( $R^2 0,915$ )

Segundo Morrison et al. (2003), para grupos relativamente pequenos, onde os leitões têm grande contato visual e auditivo com os companheiros de baia, a estimulação do consumo de alimento é influenciada pelo comportamento de outros leitões se alimentando, sendo o caso da Creche I, cujas laterais eram metálicas e vazadas. Em contrapartida, em instalações com paredes de alvenaria fechadas (como na Creche II), onde os animais têm pouco contato visual com outros, há atraso no aprendizado e indução do consumo de alimento.

Adicionalmente, o tipo de comedouro e a altura dos bebedouros podem ter influenciado o consumo de ração pelos leitões. A troca do tipo de comedouro, madeira por metálico na Creche II na segunda semana do período experimental, causou dificuldades para os animais começarem a ingerir alimento. A necessidade de adaptação dos animais ao novo tipo de comedouro foi um obstáculo para que os animais apresentassem consumo compatível com as expectativas para a fase. Barreira que os animais da Creche I não encontraram, pois desde o início do período experimental foi utilizado um único modelo de comedouro com

dimensões apropriadas, conforme prescreve os protocolos de Morés et al. (1993); Morés et al. (1998) e Dalla Costa et al. (2000).

Durante a lactação os leitões têm o leite como principal fonte de água, entretanto, depois do desmame, a falta de experiência na ingestão de água e a demora na descoberta dos bebedouros retarda o início deste consumo. Na Creche I os bebedouros eram reguláveis, o que permitiu o seu posicionamento correto, 5 cm acima da altura do dorso dos animais. Este posicionamento, segundo Dybkjaer et al. (2006), favorece a redução do tempo para que o leitão inicie e estabeleça um adequado consumo de água, melhorando assim a ingestão de alimento. Na Creche II os bebedouros fixos em um ângulo de 90°, a uma altura de 37,5 cm do solo, contrariando as recomendações para a categoria, pode ter prejudicado o consumo de água e conseqüentemente o consumo de ração, conforme defende Dalla Costa et al. (2000). Além disso, a vazão de água dos bebedouros nesta instalação, 1,8 L/min, acima da recomendada (1,0 L/min) também pode ter contribuído para que o consumo dos animais alojados na Creche II fosse 16,4% menor em relação ao consumo de ração dos animais da Creche I.

Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre os níveis dietéticos de glutamina e o tipo de alojamento para a conversão alimentar (Tabela 3). Para os animais alojados na Creche I houve efeito linear decrescente dos teores de glutamina sobre o parâmetro, ou seja, uma melhora à medida que o nível de glutamina na ração aumentou.

Os animais da Creche I, que foram suplementados com 1,0% de glutamina, apresentaram melhor conversão alimentar, 1,61 vs 2,25 (Tabela 3). Da mesma maneira, os animais da Creche I que receberam 2% de glutamina apresentaram diferença significativa na conversão alimentar em relação aos animais da Creche II, 1,42 vs 2,01. O acréscimo na suplementação de 1% para 2% de glutamina resultou na melhora de 11,7% no parâmetro, ou seja, menos 190 g de ração para 1 kg de peso vivo ganho.

O peso final foi superior para os animais alojados na Creche I (Tabela 3), conseqüência dos melhores índices de ganho de peso e consumo de ração observados para esses animais, confirmando a melhor qualidade ambiental dessa instalação.

De acordo com Mores et al. (1998) o coeficiente de variação do peso final dos animais é uma ferramenta útil, a partir da qual os produtores podem detectar problemas que possam comprometer o desenvolvimento dos animais na fase de creche e, então estabelecer medidas preventivas para evitar tais ocorrências. Apoiado nos conceitos desses autores, embora na Creche II o efeito da glutamina não tenha sido verificado, os coeficientes

de variação se mantiveram dentro de níveis considerados bons como metas a serem atingidas pelos produtores (Tabela 2).

Reconhecidamente vários fatores de risco podem comprometer o desempenho dos leitões na fase de creche (SILVA et al., 1999; MORES et al., 1993,1998; VIEIRA; VIEIRA; MADEC, 1989), sendo comum que sob estado de estresse ocorram quadros de imunodepressão temporária que podem ser responsáveis pelo aparecimento de diarreias (ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010). Na Creche II foi observado maior número de animais acometidos por diarreia em relação a Creche I (Tabela 4). Este resultado também pode explicar o menor ganho diário de peso ( $P<0,05$ ) no período de 21 dias após o desmame dos leitões da Creche II em relação à Creche I, 0,16 vs 0,23 g/ dia e, conseqüentemente o menor peso final desses leitões.

**Tabela 4** –Número de leitões que apresentaram diarreia em dois diferentes tipos de instalações.

Grau de acometimento	Tipo de Instalação		Total
	Creche I	Creche II	
Sem diarreia (0 dias)	12a	4b	16
Pouca diarreia (1-3 dias)	9b	8a	17
Muita diarreia (4 ou mais dias)	3b	12a	15
Total	24	24	48

Medias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste Qui-Quadrado 5%. Creche I: instalação com piso ripado; Creche II: instalação com piso de concreto.

#### 8.4 CONCLUSÕES

A glutamina, como suplemento dietético para leitões desmamados, demonstrou ser benéfica, favorecendo a conversão alimentar, quando as condições de ambiente apresentam baixos fatores de risco.

As influências negativas dos fatores de risco ambientais sobre os parâmetros ganho de peso, consumo de ração e incidência de diarreia sobrepõem a ação da glutamina como aditivo dietético no pós-desmame, valorizando a importância do controle destes elementos para o sucesso da fase.

## 8.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, B. Diarreia em suínos. In: \_\_\_\_\_. **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. 1 ed. Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, 2010. P. 166-206.
- BERTOL, T. M.; SANTOS FILHO, J. I. D.; LUDKE, J.V. Níveis de suplementação com lactose na dieta de leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1387-1393, 2000.
- DALLA COSTA, O.A. et al. **Caracterização do sistema hidráulico e da qualidade da água em granjas de suínos da região sul do Brasil nas fases creche, crescimento e terminação**. Concórdia : EMBRAPA-CNPSA, 2000. 5p. (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico 247).
- DONZELE, J.L.; ABREU, M.L.T.; HANNAS, M.I. **Recentes Avanços na Nutrição de Leitões**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa , 2002, 53p.
- DYBKJAER, L. et al. Eating and drinking of newly weaned piglets: effects of individual characteristic, social mixing, and addition of extra zinc to the feed. **Journal Animal Science**, v.84, p. 702-711, 2006.
- ELLIOTT, D.A.; BIOURGE, V. 2006. Critical care nutrition . **Waltham focus**, v.16, n.3, p.31-36, 2006. Disponível em: <[http://www.ivis.org/journals/vetfocus/16\\_3/en/5.pdf](http://www.ivis.org/journals/vetfocus/16_3/en/5.pdf)> Acesso em: 03/01/2013.
- FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **Experimental designs package**. 2011. Disponível em: <http://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes/ExpDes.pdf>. Acesso em: 15 junho. 2012
- HAYNES, T.E. et al. L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant or endotoxin induced death of neonatal enterocytes. **Amino Acids** v.37, p.131-142, 2009.
- HOPWOOD, D.E.; PLUSKE, JR.; HAMPSON, D.J. Dietary manipulation of infectious bowel disease. In: **Biology of Nutrition in Growing Animals**, 2005 pp. 365–385 [R Mosenthin, J Zentek and T Zebrowska, editors]. Amsterdam: Elsevier Ltd.
- JUNQUEIRA, O.M. et al. Avaliação de níveis e fontes de proteína na alimentação de leitões na fase inicial de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, p. 1622-1627, 2008.
- LI, P. et al. Amino acids and immune function. **Brazil Journal Nutrition**. v. 98, p. 237–252, 2007.
- LOPES, P.F. Efeito da glutamina sobre a parede intestinal e sua aplicabilidade potencial em coloproctologia, **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, p. 75-78, 2005.
- MACHADO, G.S. Aminogut: Ciência e prática na nutrição do leitão: O presente e o futuro dos desafios relacionados ao desmame e à nutrição na fase pós-desmame de leitões. 2007. Disponível em: <[http://www.lisina.com.br/upload/ajinomoto\\_br.pdf](http://www.lisina.com.br/upload/ajinomoto_br.pdf)>. Acesso em: 21 nov. 2012.

- MADEC, F., JOSSE, J., CHANTAL, A. Evaluation d'une methode multifactorielle dans L'analyse des troubles digestifs du sevrage. **Journées de la Recherche Porcine en France**, v. 14, p. 379-386, 1982.
- MORES, N. et al. Fatores de risco associados a diarreia pós-desmame em leitões em Santa Catarina – Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 6, 1993. Goiânia, Go. **Anais...** Goiânia, ABRAVES, p.80.
- MORES, N. et al. **Fatores de risco associados aos problemas dos leitões no período pós-desmame**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1998, 11p. (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico 226).
- MORRISON, R.S. et al. The effect of restricting pen space and feeder availability on the behavior and growth performance of entire male growing pigs in a deep-litter, large group housing system. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 83, p. 163-176, 2003.
- PARRA-SUESCUN, J.E. et al. Intestinal expression of pro-inflammatory cytokines induced by oral intake of lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* in weaned pigs. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellin, v. 26, p. 108-118, 2013.
- PIERCE, K.M. et al. Performance of Weanling Pigs Offered Low or High Lactose Diets Supplemented with Avilamycin or Inulin. **Animal Science**, v. 80, p. 313-318, 2005.
- PLUSKE, J.R. Morphological and Functional Changes in the Small Intestine of the Newly-Weaned Pig. In: \_\_\_\_\_ **Gut Environment of Pigs**. Nottingham University Press. p.01-28. 2001.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Development Core Team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Austria, 2011. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 14.09.2011.
- ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais 3**. Ed. Viçosa: UFV, DZO, 2011. 251 p.
- SILVA, C.A. et al. Ecopatologia da diarreia pós-desmame em granjas de suínos da região norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p. 39-43, 1999.
- VAN DIJK, A.J. et al. The Effect of Dietary Spray-Dried Porcine Plasma on Clinical Response in Weaned Piglets Challenged With a Pathogenic Escherichia Coli. **Veterinary Microbiology**, v. 84, p. 207-218, 2002.
- VIEIRA, R.P.; VIEIRA, H.P.; MADEC, F. Aplicação da análise multidimensional na prevenção da patologia digestiva do desmame em suinocultura intensiva. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.84, p. 229-241, 1989.
- WHITTEMORE, C.T.; GREEN, D.M. Growth of the young weaned pig. In: **The weaner pig: Nutrition and Management**, 1 ed. Wallingford 2001. p. 1-17.

## 9 ARTIGO 2

### DESEMPENHO, CORTISOL SÉRICO E CÉLULAS DE DEFESA DE LEITÕES NA FASE DE CRECHE DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI* E SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE GLUTAMINA

**Resumo:** Objetivou-se estudar a influência de diferentes níveis de glutamina em leitões desmamados e desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli*) nos parâmetros de desempenho, no leucograma e nos níveis de cortisol séricos. Foram utilizados 96 leitões, sendo 48 machos castrados e 48 fêmeas Agrocercas (PenArlan), com idade média inicial de 21 dias e  $6,06 \pm 0,852$  kg de peso médio corporal. Os animais receberam água e ração a vontade durante 30 dias que durou o experimento e foram alojados em número de dois por baía (uma macho e uma fêmea). Os tratamentos corresponderam a quatro níveis de glutamina dietética (0; 1,0; 1,5 e 2,0 %), e ausência ou presença de desafio com LPS  $0,3\mu\text{g}/\text{animal}$ , definindo um desenho experimental em modelo fatorial  $4 \times 2$ . Os desafios foram realizados no 22º, 23º, 24º, 25º e 26º dias do período experimental e as coletas de sangue realizadas nos 22º, 24º, 26º e 28º dias de experimento. Foi observado um efeito quadrático para o ganho diário de peso para os animais não desafiados, com ponto de máxima ( $0,303$  kg/dia) para a inclusão de 0,41% de glutamina e, efeito linear negativo para a conversão alimentar de animais desafiados. Houve interação para o número de leucócitos totais entre os teores de glutamina e LPS e efeito linear dos teores de glutamina dos animais não desafiados sobre o número de leucócitos totais. Para neutrófilos e linfócitos houve efeito quadrático apenas dos teores de glutamina. A suplementação de glutamina em até 2% na dieta melhora a conversão alimentar e aumentou os níveis de leucócitos totais dos animais submetidos ao desafio com LPS e favorece a imunidade celular sérica de leitões após o desmame.

**Palavras-chave:** Corticosteroides. Estresse. Leucócitos. Resposta imune.

### PERFORMANCE, CORTISOL SERUM, AND DEFENSE CELLS OF NURSERY PIGLETS CHALLENGED WITH *ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE AND SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT LEVELS OF GLUTAMINE.

**ABSTRACT:** The objective was to study the influence of different levels of glutamine for weaning piglets challenged with LPS (*Escherichia coli* Lipopolysaccharide) over performance parameters, white blood cell count and the cortisol serum levels. A total of 96 animals, 48 barrows and 48 gilts (PenArlan), were used with initial weight of  $6,06 \pm 0,852$ kg of average body weight. The animals received water and feed ad libitum during the 30 days and were housed two per cage (one male and one female). The treatments consisted of four levels of dietetic L-glutamine (0; 1,0; 1,5 e 2,0 %), and absence or presence of immune challenge with LPS  $0,3\mu\text{g}/\text{animal}$ , defining a factorial  $4 \times 2$  experimental draw. The challenges were given on day 22º, 23º, 24º, 25º e 26º of experimental period and the blood samples were performed on day 22º, 24º, 26º e 28º. It was observed quadratic effect for average daily gain to non-challenged animals, with the point of maximum ( $0.303$  kg / day) to 0.41% glutamine and negative linear effect for feed conversion ratio of challenged animals. There was interaction for the variable total number of leukocytes between glutamine levels a LPS and was observed too for this variable linear effect of glutamine levels. There was quadratic effect only for glutamine levels to the variables neutrophils and lymphocytes. Glutamine supplementation up to 2% in the diet improves feed conversion ratio for LPS challenged animals and promotes cellular immune serum of piglets after weaning.

**Keywords:** Corticosteroids. Immune response. Leukocytes. Stress.

## 9.1 INTRODUÇÃO

O desmame na suinocultura intensiva comumente é realizado precocemente, entre 21 e 28 dias de idade, resultando num período pós-desmame ainda crítico para o leitão (HAMPSON; PLUSKE; PETHICK, 2001). Alterações importantes associadas como a mudança física da dieta (líquida para sólida), do tipo de alimento, as variações nutricionais, o novo regime de refeições e o forte estresse social, somados à segregação materna e da sua leitegada de origem, têm repercussões negativas imediatas e extensivas às duas semanas subsequentes, determinando mudanças comportamentais, fisiológicas e de desenvolvimento no leitão (VARLEY; MILLER, 2002).

Do ponto de vista alimentar/nutricional a ruptura da ingestão do leite materno e a substituição desta fonte energética/proteica por produtos oriundos principalmente de origem vegetal, demandam uma adaptação morfológica, enzimática e metabólica bastante severas (PLUSKE et al., 2003), há um aumento do pH estomacal (3,8 para 4,3) (HALAS et al., 2007) com alterações na microbiota intestinal, com redução da população de bactérias benéficas em detrimento dos agentes patogênicos. Estes agentes, por sua vez, produzem metabólitos tóxicos, causando inflamação e espoliação da mucosa intestinal do leitão (SILVA; NORNBORG, 2003), culminando com quadros diarreicos e subdesenvolvimento, quando não na morte do leitão.

Este conjunto de alterações corresponde a um típico quadro de estresse, com aumento dos níveis do fator de liberação de corticotrofina (CRF) e de cortisol séricos, influenciando o comportamento animal (MOESER et al., 2007), determinando respostas que frequentemente coincidem com um aumento da produção de células do sistema imunitário (monócitos, linfócitos, macrófagos, neutrófilos) pela ativação do sistema imune, interferindo no metabolismo e na otimização do desempenho. É comum nesta fase a observação de um aumento da temperatura corporal e redução do consumo de alimentos, ocorrências que desviam os nutrientes para outros fins que não o crescimento corporal.

Neste cenário, entre muitos recursos empregados para minimizar os danos resultantes do desmame precoce, a inclusão de glutamina na dieta de leitões tem se mostrado um procedimento positivo na recuperação do leitão na fase pós-desmame.

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no organismo dos mamíferos (WU, 2009). Durante o seu processo de hidrólise são gerados produtos como o fumarato e o aspartato que podem entrar diretamente no ciclo de Krebs para gerar ATP, evidenciando, assim, o papel da glutamina como substrato energético para tecidos com alta

capacidade de multiplicação, como os enterócitos e linfócitos dos leitões (RHOADS; WU, 2009), estimulando a síntese de proteínas juntamente com o crescimento e a diferenciação celular, promovendo paralelamente a redução da degradação proteica e a apoptose (CURI et al., 2007; NEWSHOLME et al., 2003).

Devido aos inúmeros processos metabólicos que a glutamina participa e ao seu papel na recuperação de animais doentes ou que passaram por situação de estresse, como no desmame de suínos, pesquisas têm se intensificado no intuito de estabelecer a glutamina como um aminoácido condicionalmente essencial a saúde (LOPES, 2005).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar diferentes níveis de glutamina dietética para leitões desmamados e desafiados com Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, visando identificar os efeitos sobre o desempenho zootécnico e sobre as adaptações fisiológicas relacionadas.

## 9.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Foram utilizados 96 leitões da linhagem Agroceres x Penarlan, sendo 48 machos castrados e 48 fêmeas, desmamados em média aos  $21 \pm 2$  dias de idade. Ao início do experimento os animais apresentaram  $6,06 \pm 0,852$  kg de peso corporal e foram aleatoriamente distribuídos em 48 baias (24 gaiolas metálicas suspensas com piso plástico vazado e 24 baias em alvenaria com piso compacto), sendo um macho e uma fêmea por baia. Os animais receberam água e ração à vontade durante todo o período experimental, cuja duração foi de 30 dias.

As rações experimentais foram formuladas conforme recomendações nutricionais descritas por (ROSTAGNO et al., 2011) para suínos na fase pré-inicial (21 - 35 dias de idade) e inicial (36 - 50 dias de idade) e suas composições centesimais e nutricionais calculadas encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Como tratamentos experimentais foram estabelecidas dietas com diferentes suplementações de L-glutamina (0; 1,0; 1,5 e 2,0%) associadas ou não a um desafio diário com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). O programa de desafio foi realizado entre o 22º e 26º dia do período experimental, onde quarenta e oito animais receberam 0,3 µg de LPS (sorotipo 0111:B4, Sigma Aldrich®), diluído em 5 mL de leite integral, por via oral, através de gavagem, entre as 7:30 e 8:00 horas. Os demais leitões receberam oralmente 5 mL de leite integral isento de LPS.

**Tabela 1** – Composição centesimal e calculada da ração basal experimental.

Ingredientes %	Pré-inicial	Pré-inicial II
	(1-15 dias de idade)	(15-30 dias de idade)
Milho	53,26	67,78
Soja Farelo 45%	23,73	20,88
Leite desnatado em pó	10,00	4,00
Óleo de Soja	3,79	0,23
Açúcar	3,00	2,00
Leite soro em pó	2,00	2,00
Fosfato Bicalcico	1,66	1,36
Calcário Calcítico	0,64	0,70
L – Lisina HCL	0,63	0,33
Sal Comum	0,51	0,36
L- Treonina	0,29	0,09
DL- Metionina	0,24	0,05
Vitini- Sui <sup>1</sup>	0,20	0,20
L- Triptofano	0,05	0,01
Total	100,00	100,00
Valores Calculados		
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3,400	3,230
Proteína Bruta (%)	20,00	17,5
Acido Glutâmico (%)	2,91	2,91
Arginina (%)	0,97	0,96
Cálcio (%)	0,85	0,72
Fósforo Disponível (%)	0,50	0,39
Lisina Digestível (%)	1,45	1,02
Metionina Digestível (%)	0,55	0,32
Metionina + Cistina Digestível (%)	0,81	0,57

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico-mineral, composição por kg do produto: Vit A, 1.800.000 UI; Vit D3, 360.000 UI; Vit E, 4.000 UI; Vit K3, 600 mg; Vit B1, 280 mg; Vit B2, 800 mg; Vit B6, 300 mg; Vit B12, 3.600 mcg; Niacina, 6.000 mg; Ac. Pantotênico, 3.200 mg; Biotina, 20 mg; Ac.Fólico, 80 mg; Colina, 31g; Ferro, 20.000 mg; Cobre, 50.000 mg; Cobalto, 120 mg; Manganês, 11.000 mg; Zinco, 18.000 mg; Selênio, 60 mg; Iodo, 200 mg; Lisina, 140 g; Antioxidante, 20 g; veículo q.s.p., 1.000 g.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 4x2, quatro níveis de L-glutamina e duas situações de desafio (sem LPS e com LPS) de *Escherichia coli*. Os diferentes tipos de instalação foram considerados como blocos no estabelecimento do desenho experimental.

Semanalmente foram mensurados o consumo de ração e o ganho de peso dos animais. Os dados obtidos foram utilizados para estimar o consumo diário de ração, o ganho diário de peso e a conversão alimentar.

Para a análise do cortisol e do leucograma foram realizadas colheitas de sangue de 48 animais, um representante de cada baia, através da punção da veia cava cranial, utilizando-se agulhas descartáveis de 40 x 12 mm. O sangue destinado ao leucograma foi coletado em tubos contendo 0,1 mL de EDTA 10% (Acido etilenodiamino tetra-acético). A primeira colheita foi realizada no 22º dia do período experimental entre as 7:30 e 8:00 h, antes da inoculação do LPS, após jejum prévio de 8 h. As demais colheitas foram realizadas no mesmo horário no 24º, 26º e 28º dias do período experimental.

Para a determinação da concentração sérica de cortisol as amostras foram coletadas em tubos sem anti-coagulante, que foram submetidos à centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi transferido para microtubos (*eppendorf*) de 1,5 mL, identificados e conservados a -20°C para posterior análise.

O leucograma foi determinado pelo método de impedância em aparelho hematológico automatizado BC-280Vet (Mindray) em laboratório clínico-veterinário. A análise de cortisol foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) no Laboratório de Imunologia da Universidade Estadual de Londrina.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade, aditividade e homocedasticidade e posteriormente submetidos à análise de variância e regressão utilizando-se o pacote ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2011) do programa estatístico R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Para o consumo de ração, conversão alimentar e ganho de peso a baia foi considerada a unidade experimental. Para as demais variáveis o animal foi considerado a unidade experimental.

### 9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada interação entre os teores de glutamina e desafio com LPS para o ganho diário de peso e conversão alimentar. No entanto, para o consumo diário de ração e peso final não houve efeito dos fatores avaliados (Tabela 2).

Para os animais não desafiados foi observado efeito cúbico dos níveis de glutamina sobre o ganho diário de peso, com ponto de máxima (0,303 kg/dia) com a inclusão de 0,41% de glutamina (Tabela 2), sugerindo que o uso do aminoácido pode ter efeitos

positivos, com benefícios na digestão, absorção e na modulação fisiológicas do trato gastrointestinal quando os animais não são desafiados.

**Tabela 2** – Médias e coeficientes de variação do desempenho de leitões desmamados, desafiados e não desafiados com LPS (Lipopolissacarídeo de *E.coli*) suplementados com diferentes teores de glutamina na fase de creche.

	LPS	Teores de Glutamina (%)				Média	CV(%)
		0	1,0	1,5	2,0		
GDP (kg)	Não	0,24a	0,24	0,17b	0,23	0,22 <sup>1</sup>	19,71
	Sim	0,17b	0,21	0,21a	0,20	0,20	17,77
CDR (kg)	Não	0,36	0,40	0,33	0,39	0,37	17,19
	Sim	0,36	0,36	0,38	0,32	0,35	18,92
CA	Não	1,53b	1,70	1,97	1,64	1,71	20,49
	Sim	2,13a	1,70	1,75	1,58	1,80 <sup>2</sup>	21,60
PF (kg)	Não	12,76	13,08	10,87	12,71	12,36	13,07
	Sim	10,39	12,04	12,01	11,42	11,47	14,58

GDP=Ganho diário de peso; CDR= Consumo diário de ração; CA= Conversão alimentar; PF= Peso final; CV= coeficiente de variação; <sup>1</sup>.Y=0,2413+0,3269X-0,4982X<sup>2</sup> + 0,1665X<sup>3</sup>(R<sup>2</sup> =1,00) <sup>2</sup>.Y= 2,080-0,254X (R<sup>2</sup> = 0,762) Médias seguidas de letras minúscula na coluna diferem estatisticamente (F< 0,05)

Os resultados observados neste trabalho divergiram daqueles relatados por Wu; Meier; Knabe (1996), que suplementaram as rações para leitões desmamados com 0,2 e 0,6% de glutamina e não verificaram nenhum efeito sobre a conversão alimentar e o ganho diário de peso. Lee et al. (2003) ao suplementarem leitões desmamados aos 21 dias com 0,5; 1,0; 1,5% de glutamina também não verificaram diferença no ganho diário de peso para leitões não desafiados.

Por outro lado, Lackeyram; Yue; Fan. (2001), ao adicionarem 0,8% de glutamina em dietas a base de milho e farelo de soja para leitões desmamados precocemente (10 dias de idade), verificaram maior ganho diário de peso em relação aos leitões não suplementados com este aminoácido. Jiang et al. (2009) e Tucci et al (2011) observaram, respectivamente, melhora de 30,9% e 21% no ganho médio diário de peso em relação ao grupo controle (0% de glutamina) com a utilização de 0,15 e 1,0% de glutamina respectivamente .

Yi et al. (2005) relataram que a depressão no crescimento pode ser causado por diversos fatores como a perda da integridade intestinal e a diminuição da eficiência de

utilização de nutrientes. Assim é provável que, neste experimento, a suplementação com glutamina até 0,41% tenha fornecido o substrato adicional exigido pelo intestino para seu desenvolvimento, melhorando a sanidade luminal e concomitantemente o peso médio diário dos animais desmamados.

Portanto, baseado nos resultados obtidos, a inclusão de glutamina acima do nível de 0,41% na dieta não foi eficiente para melhorar o desempenho dos animais não desafiados, em particular o ganho médio diário de peso.

Para os animais que não foram suplementados com glutamina foi observado maior ganho diário de peso para os animais não desafiados (0,240 vs 0,170 kg/dia). No entanto, para os animais suplementados com 1,5% de glutamina os maiores ganhos diário de peso foram observados para os animais desafiados (0,210 kg/dia) em relação aos animais não desafiados (0,170 kg/dia) (Tabela 2). Neste sentido, é evidente o efeito benéfico da glutamina em aliviar a depressão do crescimento e a utilização ineficiente dos nutrientes pelo desafio com o LPS indicando a importância da suplementação exógena de glutamina, que pode atuar como regulador metabólico para aumentar a síntese protéica e diminuir o catabolismo protéico em processos infecciosos e inflamatórios (LOBLEY; HOSKIN; McNEIL, 2001), mantendo a taxa de deposição de proteína no músculo esquelético.

Para um nível maior de glutamina dietética (2%), Hsu et al. (2012) observaram maior ganho médio diário para leitões desmamados aos 28 dias que foram castrados (um outro fator de estresse imputado) e desafiados com LPS (25µg/kg peso vivo) aos 7 e 14 dias após o desmame, respectivamente, quando comparados com o grupo isento de glutamina. Essa melhora sugere que a suplementação dietética de glutamina alivia em parte o estresse causado pela castração e pelo desafio com LPS, embora a intensidade destes desafios seja distinta e de difícil mensuração, fato que pode explicar a razão por que diferentes níveis de glutamina dietética determinam diferentes respostas nas avaliações experimentais.

Desafios que levam a alterações inflamatórias são conhecidos por provocar uma grande variedade de respostas fisiológicas (KELLEY; JOHNSON; DANTZER. 1994), assim, o menor ganho de peso observado para os animais desafiados e não suplementados com glutamina pode ser explicado pela provável ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal, reduzindo a concentração intracelular de glutamina, alterando o metabolismo intermediário e a absorção de nutrientes, conforme trata Newsholme (2001).

Dritz et al. (1996) também verificaram diminuição no ganho médio diário de leitões desafiados, no entanto a queda de 11% no ganho de peso foi consequência do menor consumo diário de ração.

Jiang et al. (2009) verificaram aumento de 15% no consumo de ração em leitões suplementados com 0,15% de glutamina e desafiados com 200 µg LPS/ kg de peso vivo, em relação ao grupo suplementado com 0,15% de glutamina e isento do desafio. Neste trabalho, a melhora no ganho diário de peso dos animais desafiados e suplementados com 1,5% de glutamina, sem incremento do consumo de ração, pode ser resultado do melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, uma vez que, de acordo com Tucci et al. (2011), a suplementação de glutamina promove aumento na atividade da amilase e da tripsina pancreática dos leitões melhorando assim a digestibilidade.

Para os animais suplementados com 1,0 e 2,0% de glutamina não foram observadas diferenças no ganho diário de peso entre animais desafiados e não desafiados (Tabela 2). Os resultados são semelhantes aos observados por Yi et al. (2005), que também não verificaram efeito da suplementação de 2% glutamina sobre o desempenho de leitões desmamados aos 17 dias de idade quando estes não foram desafiados imunologicamente. Também pode-se atribuir que em condições de homeostase a síntese de glutamina a partir de outros aminoácidos seria capaz de prover a necessidade do animal (GOMEZ et al .,1994 ; KITT; MILLER; FISCHER, 2003).

Para a conversão alimentar observou-se efeito linear decrescente em função dos teores de glutamina para os animais desafiados, com redução de 0,254 na conversão alimentar para cada ponto percentual de inclusão de glutamina. Os resultados concordam com Hsu et al. (2012), que trabalhando com leitões desmamados aos 28 dias, suplementados com 2% de glutamina, castrados aos 7 dias após o desmame e desafiados com 25µg de LPS/kg de peso vivo observaram melhora na conversão alimentar quando comparado com os animais sem suplementação de glutamina.

Também este efeito positivo verificado para a conversão alimentar pode ser explicado pela hipótese proposta por Fox; Kripke e Berman (1988), que relataram que a glutamina pode agir na manutenção do metabolismo, estrutura e função intestinal, atenuando a depressão do crescimento e a atrofia das vilosidades da mucosa dos animais desafiados com LPS, promovendo maior absorção dos nutrientes da dieta e concomitantemente a melhora da eficiência alimentar. Por outro lado, contrário ao observado neste trabalho, Jiang et al. (2009) não identificaram melhora na conversão alimentar de leitões desafiados com 200µg de LPS/kg de peso vivo e que receberam 0,15% de glicil/glutamina, em relação aos animais que não foram desafiados e isentos de glutamina. Atribui-se que possivelmente os leitões não conseguiram compensar o baixo consumo médio diário, devido ao desafio com altos níveis de LPS.

Também foi observada uma diferença ( $P < 0,05$ ) na conversão alimentar, para o grupo que não recebeu glutamina suplementar, entre os animais que não foram desafiados e os desafiados com LPS (1,53 vs 2,13). Segundo Solloum; Copeland e Souba. (1991), em processos de estresse metabólico ocorre uma redução do transporte luminal da glutamina e da atividade da glutaminase da mucosa. Existe assim a possibilidade que o intestino seja subserviente às necessidades de outros órgãos, como parte do processo de priorização da síntese proteica e dessa maneira seja comprometido o aproveitamento dos nutrientes.

Para os teores de cortisol foi verificado efeito da interação entre teores de glutamina e LPS (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de cortisol sérico (ng/mL) em função dos teores de glutamina na ração e desafiado ou não com LPS (Lipopolissacarídeo de *E.coli*).

Desafio	Teores de Glutamina %				Média	CV (%)
	0	1,0	1,5	2,0		
Sem LPS	33,4765 <sup>b</sup>	116,8110 <sup>a</sup>	102,4782 <sup>b</sup>	108,1635 <sup>a</sup>	89,80 <sup>1</sup>	61,39
Com LPS	105,7695 <sup>a</sup>	68,6617 <sup>b</sup>	126,7147 <sup>a</sup>	104,6833 <sup>a</sup>	101,30 <sup>2</sup>	40,41

CV= coeficiente de variação; <sup>1</sup> $\hat{Y} = 34,9786 + 110,4813x - 38,0710x^2$  ( $R^2 = 0,9407$ ); <sup>2</sup> $\hat{Y} = 105,7695 - 335,9840x + 430,0320x^2 - 131,1558x^3$  ( $R^2 = 1,00$ ) Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Para os animais que não receberam LPS houve efeito quadrático dos teores de glutamina sobre os valores de cortisol. O valor máximo de cortisol foi obtido com a inclusão de 1,45% de glutamina, resultando em 115,131 ng/mL de cortisol. Para os animais que receberam LPS houve efeito cúbico dos teores de glutamina sobre os valores de cortisol. Os pontos de máxima e de mínima foram obtidos com a inclusão de 1,68 e 0,51% de glutamina, respectivamente, obtendo-se os valores de 133,15 e 28,87 ng/mL de cortisol.

Em relação aos teores de glutamina, houve diferença significativa entre os animais desafiados e não desafiados para os teores 0; 1,0 e 1,5%, porém para 2% de glutamina não houve diferença significativa entre os animais que receberam ou não receberam LPS com relação ao cortisol (Tabela 3).

A ativação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, via exposição às baixas doses de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS), aumenta os níveis de cortisol no sangue como indicador do nível de estresse que o animal é submetido, simulando o desafio para leitões desmamados durante a fase de creche (WRIGHT et al., 2000; WEBEL et al., 1997). Paralelamente, há um aumento significativo da utilização de glutamina (NEWSHOLME,

2001) como resposta à presença de macrófagos, elevando a produção de interleucina 1 (IL-1), a secreção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), de interleucina 6 (IL-6) (MURPHY; NEWSHOLME, 1999) e interleucina 8 (IL-8) (NEWSHOLME, 2001), que dependem da disponibilidade extracelular de glutamina.

Normalmente o pico de cortisol em leitões desmamados ocorre por volta de 2 h pós-desafio com LPS (PARROT et al., 1995), momento na qual os animais começam a apresentar sintomas próprios de uma infecção bacteriana aguda (ROITT; DELVES, 2004), podendo até mesmo desencadear a morte do animal, dependendo da dose utilizada no ensaio. Posteriormente, até 16 horas pós-desafio, há diminuição dos níveis plasmáticos de cortisol até atingir níveis basais (WRIGHT et al., 2000).

Neste ensaio esperava-se que os níveis de cortisol sanguíneo dos animais que não receberam glutamina, independentemente de terem recebido ou não LPS, fossem semelhantes aos níveis basais de animais não estressados, cujos valores oscilam entre 2,5-3,5mg/dL, segundo Weibel et al. (1997); Johnson; Von Borrel. (1994). No entanto, esses valores, bem como os efeitos quadráticos e cúbicos encontrados neste ensaio para animais desafiados e não desafiados com LPS, suplementados com os diferentes teores de glutamina, foram discrepantes dos verificados na literatura.

Yi et al. (2005); Wright et al. (2000) e Warren et al. (1997) observaram que 24 h pós-desafio os níveis de cortisol diminuíram até níveis basais normais. Acredita-se que neste trabalho, quando os animais começaram a fase de desafio e foram submetidos à colheita de sangue (42º dia de vida), já acusavam estresse devido aos fatores de ambiência ainda presentes e percebidos nos primeiros 21 dias pós desmame e ao manejo de contenção para o fornecimento da dose de LPS ou placebo via oral, além da própria contenção e colheita de sangue que provocou um estresse adicional. Isto denota que mesmo para os teores de 1,0; 1,5 e 2,0% de glutamina não houve resposta suficiente para evitar o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e para a diminuição dos níveis de cortisol plasmático. Estes resultados se identificam com as observações apresentadas por Liu et al. (2008).

A idéia da suplementação com glutamina tem como objetivo principal fornecer ao fígado uma quantidade adequada de aminoácidos para a fase aguda do catabolismo e reparar os tecidos e órgãos, principalmente o músculo esquelético, modulando a resposta ao estresse que se encontra mediada pelo sistema nervoso simpático, glucagon, cortisol, insulina, hormônio do crescimento, citocinas e lipídios mediadores (NEWSHOLME, 2001).

Avaliando a dosagem utilizada de LPS como desafio, Warren et al. (1997) verificaram que doses de 5 a 50  $\mu\text{g}$  LPS/kg de peso corporal provocaram aumento nas concentrações de TNF $\alpha$  e cortisol, induzindo à anorexia, sonolência e febre. Os mesmos autores afirmaram que, embora 0,5  $\mu\text{g}$  de LPS/kg de peso corporal também produza anorexia, sonolência e febre, o incremento plasmático de cortisol e de TNF $\alpha$  é pequeno e transitório. A utilização de 0,3  $\mu\text{g}$  de LPS/leitão neste ensaio não seguiu o padrão fisiológico de cortisol moderado ou transitório durante as coletas, e com as subsequentes injeções de LPS esperava-se que as respostas fossem reduzidas em comparação ao primeiro desafio. Esta proposição é atribuída ao efeito de tolerância ao LPS (VAN HEUGTEN; SPEARS; COFFEY, 1994; CHEDID; PARANT, 1971).

A suplementação de 2% de glutamina não resultou diferença entre os leitões desafiados ou não com LPS, revelando que embora os dados difiram daqueles relatados na literatura, a glutamina conseguiu manter o nível de cortisol similar ao dos animais não desafiados com LPS (Tabela 3).

Hsu et al. (2012) avaliaram os níveis de cortisol sanguíneo de leitões desmamados aos 28 dias e suplementados com 0 e 2% de glutamina em dois momentos, após a castração, realizada aos 7 dias pós-desmame e no 14<sup>o</sup> dia pós-desmame. Também foi somado ao procedimento a administração, via parenteral, 4 h após as castrações, de 25  $\mu\text{g}$  LPS/kg de peso corporal. Os autores verificaram que a suplementação com glutamina foi capaz de aliviar a condição estressante e a inflamação associada com a castração nos machos desmamados, melhorando a sua imunidade e o desempenho na fase inicial da creche. Porém, quando desafiados com LPS, houve um aumento do cortisol nos diferentes tratamentos, mas não foi verificada diferença significativa entre os mesmos. Os autores concluíram que teores menores que 2% de glutamina podem não melhorar a resposta imune dos leitões na fase inicial do crescimento.

Na avaliação sérica das células de defesa, para o valor de leucócitos totais e linfócitos houve interação entre os fatores glutamina e desafio (Tabela 4). Para os animais não desafiados houve efeito linear dos teores de glutamina sobre o número de leucócitos. Entre os animais não desafiados houve efeito quadrático dos teores de glutamina sobre o número de linfócitos. Para neutrófilos houve apenas efeito dos teores de glutamina.

**Tabela 4** –Valores do leucograma de leitões em função dos teores de glutamina e desafiados ou não com LPS (Lipopolissacárideo de *E. coli*).

	Teores de Glutamina				ER	CV (%)
	0	1,0	1,5	2,0		
	Leucócitos (n <sup>o</sup> /mm <sup>3</sup> )					
Desafiados	17703 <sup>a</sup>	17335 <sup>a</sup>	16014	19082 <sup>a</sup>	---	35,82
Não desafiados	14044 <sup>b</sup>	14965 <sup>b</sup>	18362	17250 <sup>b</sup>	1	34,46
	Eosinófilos (n <sup>o</sup> /mm <sup>3</sup> )					
Desafiados	227	141	149	217	---	35,82
Não desafiados	228	159	163	172	---	34,46
	Monócitos (n <sup>o</sup> /mm <sup>3</sup> )					
Desafiados	272	352	218	433	---	39,50
Não desafiados	229	294	322	324	---	40,02
	Neutrófilos (n <sup>o</sup> /mm <sup>3</sup> )					
Desafiados	8226	7172	7436	9120	2	31,38
Não desafiados	5674	6182	8186	9157		30,16
	Linfócitos (n <sup>o</sup> /mm <sup>3</sup> )					
Desafiados	8953 <sup>a</sup>	9660 <sup>a</sup>	8192 <sup>b</sup>	9295 <sup>a</sup>		25,85
Não desafiados	7891 <sup>a</sup>	8301 <sup>b</sup>	9679 <sup>a</sup>	7347 <sup>b</sup>	3	25,71

ER= Equação de regressão; <sup>1</sup>  $\hat{Y} = 13929,907 + 1975,748x$  ( $R^2 = 0,6993$ ); <sup>2</sup>  $\hat{Y} = 6914,17 - 1383,048x + 1259,679x^2$  ( $R^2 = 0,9924$ ); <sup>3</sup>  $\hat{Y} = 7755,15 + 2580,77x - 1300,52x^2$  ( $R^2 = 0,4423$ ), Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

No momento do desmame o animal apresenta um decréscimo na capacidade de resposta dos linfócitos circulantes, menor concentração de anticorpos contra antígenos inoculados e uma maior possibilidade para a presença de problemas respiratórios e diarreicos (BLECHA e KELLEY, 1981; BLECHA; POLLMAN; NICHOLS, 1983). Em processos inflamatórios, como o estresse agudo por LPS, é necessário o recrutamento rápido de leucócitos no local onde está ocorrendo a infecção, que os levam a migrar do sangue, induzindo à alterações no número e na porcentagem de leucócitos presentes no sangue (DHABHAR, 1998). No início do processo inflamatório ocorre aumento no número de leucócitos no sangue. Como a resposta ao estresse, continua a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando na liberação de glicocorticoides que ajudam na redistribuição dos leucócitos, culminando na diminuição dos leucócitos no sangue (DHABHAR, et al., 1995; DHABHAR; MCEWEN, 2001).

As concentrações de leucócitos totais nos animais do presente trabalho foram maiores do que os relatados por Abreu et al. (2010); Davis et al. (2006); Kleinbeck e Mcglone (1999) e Tumbleson (1986). No entanto, as proporções das diferentes populações de leucócitos estavam dentro dos valores normais para a espécie suína, segundo Meyer; Coles e Rich (1995).

A inclusão dos diferentes teores de glutamina na ração dos animais desafiados não foi eficiente para alterar o número de leucócitos no sangue. A baixa dosagem

de LPS a que os animais foram submetidos (0,3µg/animal) não estimulou a utilização de glutamina pelos macrófagos, neutrófilos e linfócitos para sintetizar e secretar citocinas pró-inflamatórias, podendo justificar a ausência do efeito da glutamina no número de leucócitos dos leitões durante o período experimental. Esta observação, que aponta que o baixo nível de glutamina dietética não determina efeitos nestes parâmetros é sustentada por Johnson; Von Borrel (1994). No entanto, o baixo desafio com o LPS apresentou diferença nos níveis de leucócitos quando foram comparados os animais desafiados e não desafiados para os teores de glutamina (0; 1,0; e 2,0%), demonstrando que o LPS estimula o aumento de leucócitos no sangue periférico e que este aumento é dependente da quantidade de glutamina extracelular presente no momento do desafio, conforme tratam Murphy; Newsholme (1999) e Yassad et al. (1997). Por outro lado, Tumbleson (1986) cita que as concentrações de leucócitos totais variam de acordo com a genética, o ambiente e o estado de saúde dos animais dentro de um rebanho, justificando que o entendimento da ação da glutamina nestes parâmetros guarda certa complexidade.

Em condições normais de alimentação pouca glutamina derivada da proteína dietética entra na corrente sanguínea. Assim, as células epiteliais do intestino irão consumir a maior parte da glutamina dietética que será utilizada como combustível respiratório (NEWSHOLME, 2001). Neste ensaio foi verificado um efeito linear positivo para a contagem de leucócitos nos animais não desafiados e altos níveis de cortisol séricos. Billings et al. (1990) tratam que os altos valores séricos de cortisol estimulam a liberação da glutamina sintetase, aumentando a presença de glutamina na corrente sanguínea, que pode colaborar com a proliferação de leucócitos, além de prover a conversão de glutamina em arginase e de arginase em óxido nítrico, suprimindo as demandas dos macrófagos ativados (MURPHY; NEWSHOLME, 1998) pela presença de um desafio ambiental durante o ensaio.

Também foi verificado efeito linear positivo para a proliferação de leucócitos nos animais não desafiados que foram suplementados com teores crescentes de glutamina. Com este resultado pode-se observar que a inclusão de glutamina na dieta promoveu melhora no metabolismo e no aumento das concentrações de leucócitos do sangue periférico. Estas observações são compartilhadas por Newsholme et al. (2003); Kew et al. (1999); Wu; Flynn (1995), Nesta mesma linha Shewchuk, Baracos e Field, (1997); Li et al. (1997); Adjei et al. (1994); Inoue, Grant e Snyder (1993) e Ardawi (1991), respectivamente, trabalhando com diferentes espécies de roedores, também apontaram maior proliferação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos nos animais tratados com glutamina em comparação aqueles que não receberam glutamina.

A contagem de neutrófilos para os animais que foram desafiados ou não com o LPS não se mostrou diferente, no entanto foi verificado um efeito quadrático para os teores de glutamina com ponto de mínima de 6534 neutrófilos/mm<sup>3</sup> quando os animais foram suplementados com 0,5% de glutamina, apontando que a glutamina tem um efeito sobre os níveis de neutrófilos do sangue periférico e modulando a resposta imunitária conforme citaram Ogle et al. (1994).

Da mesma forma, a inclusão de 4% de glutamina na ração, em estudo conduzido por Yoo; Field e Mc Burney (1997), influenciou positivamente a contagem de neutrófilos de leitões desmamados aos 21 dias e desafiados com *E. coli* 0,5 x 10<sup>8</sup> UFC/kg de peso em relação aos animais que não receberam glutamina e não foram desafiados. Segundo Furukawa et al. (2000) e Saito; Furakawa e Matsuda. (1999), o aumento da suplementação de glutamina melhora a proliferação, a atividade fagocítica e a taxa de produção de superóxido (radical livre necessário para a morte bacteriana), podendo diminuir em 26% o número de *E. coli* presente após um desafio.

Para Oehler e Roth (2003), o efeito positivo da glutamina na melhora da atividade fagocítica dos neutrófilos nos animais desafiados pode ser devido ao seu efeito sobre a enzima NADPH oxidase que produz superóxido e trabalha de forma sinérgica no processo de degradação das bactérias fagocitadas.

Não houve efeito para os animais que receberam ou não LPS na contagem dos linfócitos, porém foi verificado um efeito quadrático para os teores de glutamina com ponto de máxima de 9035 linfócitos/ mm<sup>3</sup> para o teor 0,99% de glutamina nos animais não desafiados. A glutamina é o principal substrato energético para os linfócitos (WU; FIELD; MARLISS, 1991) e tem papel importante para a função das células B e T (NEWSHOLME, 2001). No presente trabalho, baseado nos conceitos de Li et al. (2007), a inclusão de glutamina até 0,99%, possivelmente proporcionou a energia suficiente para ajudar na proliferação de linfócitos em resposta à produção de citocinas pró-inflamatórias em decorrência do desafio com o LPS. A partir desse ponto o número de linfócitos diminuiu, provavelmente, pelo aumento da liberação do hormônio corticotrófico, como destaca Macari e Luqueti (2002). Este resultado está de acordo com relatos de que a suplementação de glutamina suporta a função imune durante estados críticos (INOUE; GRANT; SNYDER, 1993), mas não tem efeito em estados saudáveis (SHEWCHUCK; BARACOS; FIELD, 1997).

Os leitões que foram suplementados com 1 e 2% de glutamina e que foram desafiados com LPS apresentaram um maior número de linfócitos que os animais que não foram desafiados. No entanto para o teor 1,5% esta diferença se inverteu.

Valores superiores encontrados para linfócitos no sangue de leitões tratados com LPS ( $P < 0,05$ ) possivelmente sejam devido à glutamina dietética que estimula a proliferação celular dos tecidos linfóides associados ao intestino delgado (ALVERDY, 1990), aumentando as concentrações extracelulares de glutamina e melhorando o balanço nitrogenado, estimulando a proliferação e a resposta dos linfócitos aos mitogênicos (KEW et al., 1999; MORLION et al., 1998) por meio da produção de anticorpos, principalmente das imunoglobulinas G (HUAYNATE, 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho divergem dos encontrados por Jiang et al. (2009), que não verificaram em leitões diferença na proliferação de linfócitos por parte do desafio com LPS (200 $\mu$ g/kg peso) e da suplementação com 0,15% de glicil-glutamina, comparados com aqueles que não foram desafiados e que não receberam glutamina, evidenciando que a glicil-glutamina pode ser capaz de limitar a resposta pró-inflamatória.

Da mesma maneira, Liu et al. (2003) não verificaram diferenças na proliferação de linfócitos em leitões desmamados aos 28 dias e desafiados com LPS (200 $\mu$ g/kg peso) no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós desmame e suplementados com 7% de óleo de milho e 7% de óleo de peixe.

De acordo com Williams et al. (2009); Tumbleson (1986) e Dvorak (1968), existe uma correlação positiva entre o desafio com LPS e a produção de leucócitos, contudo neste trabalho não foi verificado efeito para os valores de eosinófilos e monócitos, onde a contagem permaneceu inalterada durante o período experimental.

#### 9.4 CONCLUSÕES

A suplementação de glutamina em até 2% na dieta melhora a conversão alimentar dos animais submetidos ao desafio com LPS de *E. coli*.

Respostas positivas relacionadas à imunidade sérica em leitões após o desmame e desafiados com LPS provém da suplementação de glutamina, suportando e ratificando sua indicação para esta categoria nesta fase crítica de vida do leitão.

## 9.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.L.T. et al. Glutamina, nucleotídeos e plasma suíno em rações para leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 520-525, 2010.
- ADJEI, A.A. et al. Dietary arginine and glutamine combination improves survival in septic mice. **Nutrition Research**, v.14, p. 1591–1599, 1994.
- ALVERDY, J.C. Glutamine supplemented diets on immunology of the gut. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, p. 109–113, 1990
- ARDAWI, M.S.M .Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on septic rats. **Clinical Science**, v. 81, p. 215–222, 1991.
- BILLINGS, P.M. et al. Effects of physiological and pathological levels of glucocorticoids on skeletal muscle glutamine metabolism in the rat. **Biochemical Pharmacology**. v. 40, p.1145–1148. 1990.
- BLECHA, F.; KELLEY, K.W. Effects of cold and weaning stressors on the antibody mediated immune response of pigs. **Journal of Animal Science**, v.53, p.440-447, 1981.
- BLECHA, F.; POLLMAN, D.S.; NICHOLS, D.A. Growth and developmental biology weaning pig at an early age decrease cellular immunity, **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 396-400, 1983.
- CHEIDID, L.; PARANT, M. Role of hypersensitivity and tolerance in reactions to endotoxins. In: Kadis, S.; Weinbaum, G.; Ajl, S. J. **Microbial Toxins**. vol. 5. Academic Press, New York, 1971. p. 415
- CURI, R. et al. Glutamine, gene expression and cell function. **Frontier in Bioscience**, v.12, p. 344-357, 2007.
- DAVIS, M.E. et al. Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean to finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well being. **Journal of Animal Science**. v. 84, p. 743-756, 2006.
- DHABHAR, F.S: Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. **Annals of the New York Academy of Science**, v.840, p. 359–372, 1998.
- DHABHAR, F.S. et al. Effects of stress on immune cell distribution – dynamics and hormonal mechanisms. **The Journal of immunology**, v. 154, p. 5511–5527, 1995.
- DHABHAR, F.S.; MCEWEN, B.S: **Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: possible explanations for paradoxical observations**; in Ader R, Felten DL, Cohen N (eds): Psychoneuroimmunology, ed 3. San Diego, Academic Press, 2001, pp 301–338.
- DRITZ, S.S. et al. Influence of lipopolysaccharide-induced immune challenge and diet complexity on growth performance and acute-phase protein production in segregated early-weaned pigs. **Journal Animal Science**, v.74, p.1620-1628, 1996.

DVORAK, M. The effect of traumatic stress on the leucocyte blood picture in the course of the postnatal development of piglets. **Acta Universitatis Agriculturae Facultas Veterinaria**, v.37, p.537–544. 1968.

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

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **Experimental designs package**. 2011. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes/ExpDes.pdf>>. Acesso em: 15 junho. 2012.

FURUKAWA, S. et al. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients *in vitro*. **Nutrition**, v. 16, p. 323–329. 2000.

GÓMEZ, G.G. **Glutamine supplemented for unstressed and stressed** (Rotavirus enteritis) neonatal piglets, 1994. Disponível em <[http://cals.ncsu.edu/an\\_sci/ann\\_rep94/gggom93.html](http://cals.ncsu.edu/an_sci/ann_rep94/gggom93.html)>, acessado em 02/01/2012.

HALAS, D. et al. Effect of dietary supplementation with inulin and/or benzoic acid on the incidence and severity of post-weaning diarrhoea in weaner pigs after experimental challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Archives of Animal Nutrition**, v. 63, p. 267-280, 2009

HAMPSON, D. J.; PLUSKE, J. R.; PETHICK, D. W. Dietary manipulation of enteric disease. **Pig News and Information**. v.22, p. 21-28, 2001.

HSU, C.B. et al. Effects of supplemental glutamine on growth performance, plasma parameters and LPS-induced immune response of weaned barrows after castration. **Asian Australasian Journal of animal Science**. v. 25, p. 674-681, 2012.

HUAYNATE, R.A.R. **Probióticos em dietas de suínos**. 2008. 65f. (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

INOUE, Y.; GRANT J.P.; SNYDER, P.J. Effect of glutamine-supplemented intravenous nutrition on survival after *Escherichia coli*-induced peritonitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 17, p. 41–46, 1993.

JOHNSON, R. W.; VON BORELL, E. Lipopolysaccharide-induced sickness behavior in pigs is inhibited by pretreatment with indomethacin. **Journal of Animal Science**, v.72, p.309–314, 1994.

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

KELLEY, K. W.; JOHNSON, R. W.; DANTZER, R. Immunology discovers physiology. **Veterinary of Immunologic Immunopathologic**, v. 43, p.157–165, 1994.

KEW, S. et al. Dietary glutamine enhances murine T-Lymphocyte responsiveness. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1524-1531. 1999.

KITT, S.J.; MILLER, P.S.; FISCHER, R.L. Effects of glutamine on growth performance and intestinal development of immune challenged weanling pigs fed chemically defined diets. **Nebraska Swine Report**, p. 34-38, 2003.

KLEINBECK, S.N.; Mc GLONE J. J. Intensive indoor verses outdoor swine production systems: Genotype and supplemental iron effects on blood hemoglobin and selected immune measures in young pigs. **Journal of Animal Science**.v. 77, p.2384–2390. 1999.

LACKEYRAM D.; YUE, X.; FAN, M.Z. Effects dietary supplementation of crystalline L-glutamine on the gastrointestinal tract and whole body growth in 15 early weaned piglets fed corn and soybean meal based diets. **Journal of Animal Science**, v. 79, p.230-231, 2001.

LEE, D.N. et al. Effect of dietary glutamine supplement on performance and intestinal morphology of weaned pig. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 16, p. 1770-1776, 2003.

LI, J. et al. Effect of glutamine enriched total parenteral nutrition on small intestinal gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. **Surgery**, v. 121, p.542–549, 1997.

LI, P. et al.. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**. v. 98, p. 237-252. 2007.

LIU, Y.L. et al. Effects of fish oil supplementation on the performance and the immunological, adrenal, and somatotropic responses of weaned pigs after an Escherichia coli lipopolysaccharide challenge. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2758-2765, 2003.

LIU, Y.L. et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in weaned pigs. **British Journal Nutrition**, v.100, p. 552-560, 2008.

LOBLEY, G. E.; HOSKIN, S.O.; MCNEIL, C. J. Glutamine in animal science and production. **Journal of Nutrition**. V. 131, P.255-2531, 2001.

LOPES,P.F. Efeito da glutamina sobre a parede intestinal e sua aplicabilidade potencial em coloproctologia, **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, p. 75-78, 2005.

MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia Cardiovascular. In: **Fisiologia aviaria aplicada a frango de corte**. Jaboticabal. São Paulo, 2002. p. 17-36.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. Testes e Distúrbios dos Leucócitos. In\_\_\_\_\_. **Medicina de Laboratório Veterinária Interpretação e Diagnóstico**. 1 ed. São Paulo: Roca, 1995, p. 23-37.

MOESER, A.J. et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**. V. 292, p. 173-181, 2007.

MORLION, B.J. et al. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. **Annals of Surgery**, v. 227, p. 302–308. 1998

MURPHY, C. J.; NEWSHOLME, P. The importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. **Clinical Science**. v.95, p.397–407. 1998

MURPHY, C. J. ; NEWSHOLME, P. Macrophage-mediated lysis of a b-cell line, TNF- $\alpha$  release from BCG-activated murine macrophages and IL-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. **Clinical Science**. v. 96, p.89–97. 1999.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection?. **Journal of Nutrition**. v. 131, p. 2515-2522, 2001.

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

OEHLER, R ; ROTH, E. Glutamine Metabolism. In: Cynober, L. **Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease**. 2. ed. Boca Raton, FL CRC Press. 2003. P. 169-182.

OGLE, C.K. et al. Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.18, p. 128–133, 1994.

PARROT, R.F. et al. Cyclo-oxygenase mediation of endotoxin-induced fever, anterior and posterior pituitary hormone release, and hypothalamic c-fos expression in the prepubertal pig. **Experimental Physiology**, v. 80, p.663-674, 1995.

PLUSKE, J.R. et al. Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 54, p. 515-527, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Development Core Team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Austria, 2011. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 14.09.2011.

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

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de imunologia**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 489p.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. 3.ed. Viçosa: UFV. 2011.

SAITO, H.; FURUKAWA, S.; MATSUDA, T. Glutamine as an immune enhancing nutrient. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 23, p. S59. (abs), 1999.

SHEWCHUK, L.D.; BARACOS, V.E.; FIELD, C.J. Dietary L-glutamine supplementation reduces growth of the Morris hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 158–166, 1997.

SILVA DA, L.P.; NORBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, p. 983-990, 2003.

SOLLOUM, R.M.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. Brush border transport of glutamine and other substrates during sepsis and endotoxemia. **Annals of Surgery**. v. 213, p. 401-410, 1991.

TUCCI, F.M. et al. Agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a atividade das enzimas digestivas e o desempenho. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 48, p. 289-298, 2011.

TUMBLESON M. E, Swine hematology. In: SCHMIDT, D. A.; TUMBLESON M. E. **Swine in Biomedical Research**. New York: Plenum Press, 1986. p. 776–779.

VAN HEUGTEN, E.; SPEARS, J.W.; COFFEY, M.T. The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2661-2669, 1994.

VARLEY, M. MILLER, B. Gut Health and immunity in young pigs. In: **Recent advances in animal nutrition**. Ed. P.C. Garnsworthy, J. Wiseman. Nottingham University Press, 2002.p. 195-209.

WARREN, E. J. et al. Coincidental changes in behavior and plasma cortisol in unrestrained pigs after intra cerebroventricular injection of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Endocrinology**, v. 138, p. 2365–2371, 1997.

WEBEL, D. M. et al. Time course of increased plasma cytokines, cortisol and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**. v. 75, p. 1514 – 1520, 1997.

WILLIAMS, P.N. et al. Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 139-147, 2009.

WRIGHT, K. J. et al. Integrated adrenal, somatotropic, and immune responses of growing pigs to treatment with lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1892 – 1899. 2000.

WU, G.; FLYNN, N.E. Regulation of glutamine and glucose metabolism by cell volume in lymphocytes and macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 343–350, 1995.

WU, G.Y.; FIED, C.J.; MARLISS, E.B. Glutamine and glucose metabolism in rat splenocytes and mesenteric lymph node lymphocytes. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. 141-147, 1991.

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

WU, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, p. 1-17, 2009.

YASSAD, A. et al. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 413, p. 81-84, 1997.

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

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