

GUSTAVO DE AMORIM RODRIGUES

**SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA PARA FÊMEAS SUÍNAS NULÍPARAS NO
TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alysson Saraiva

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R696s
2021
Rodrigues, Gustavo de Amorim, 1996-
Suplementação de L-arginina para fêmeas suínas nulíparas
no terço final de gestação [recurso eletrônico] / Gustavo de
Amorim Rodrigues. – Viçosa, MG, 2021.
30 f.: il.

Inclui anexo.

Orientador: Alysson Saraiva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 20-25.

1. Suínos - Alimentação e ração. 2. Feto -
Desenvolvimento. 3. Músculos esqueléticos. 4. Aminoácidos.
5. Miogênese. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
II. Título.

CDD 22. ed. 636.40855

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6/2578


GUSTAVO DE AMORIM RODRIGUES

**SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA PARA FÊMEAS SUÍNAS NULÍPARAS NO
TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de julho de 2021.

Assentimento:


Gustavo de Amorim Rodrigues

Autor


Alysson Saraiva
Orientador

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus por me dar a dádiva da vida e por me fortalecer para que eu pudesse chegar ao fim desse desafio.

Aos meus pais, Jairo e Angélica, que sempre foram a minha base e nunca mediram esforços para realização dos meus sonhos, além da paciência, conselhos e companheirismo em todos os momentos. Ao meu irmão Guilherme e a minha cunhada Ana Paula pelo apoio e por torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional. Estendo, também, o agradecimento a todos da minha família pelo apoio e incentivo durante essa jornada.

Agradeço a minha namorada Tayuana pelo afeto, cumplicidade e por ser minha companheira nesse e em muitos outros momentos importantes e especiais da minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia por me proporcionarem a realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Ciência Animal (INCT-CA) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Alysso Saraiva, por todos os ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidos e pela orientação e execução deste estudo. Agradeço também aos professores Arele A. Calderano, Gabriel C. Rocha e Mariana M. Neves, pela disponibilidade, atenção e contribuições para esse estudo.

Aos meus amigos e equipe de trabalho, Dante, Livia e Marcos, obrigado por se dedicarem a esse projeto e pelos bons momentos de descontração durante essa caminhada. Aos estagiários e amigos Caroline, Fernanda e Lucas pela ajuda na execução desse projeto.

Aos colegas do laboratório de Biologia Estrutural, LABTEC e do laboratório de Biologia Muscular e Nutrigenômica por me auxiliar na execução das análises, pelos ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos de UFV e Viçosa, Bruno, Leonardo, Karine, Maykelly, Graziela, Amanda, Kamilla, Kelly, Carlos, Joyce, Pedro, Bárbara e Carla pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários a UEPE – Suinocultura, Arlindo, Fernando, José Alberto (Dedeco), Leandro e Valdeir, pela amizade, ajuda na execução do experimento e por fazer do ambiente de trabalho um lugar tão acolhedor.

A vocês, muito obrigado!

RESUMO

RODRIGUES, Gustavo de Amorim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Suplementação de L-arginina para fêmeas suínas nulíparas no terço final da gestação.** Orientador: Alysson Saraiva.

A suplementação materna com L-arginina vem sendo avaliada como alternativa capaz de contribuir para maior desenvolvimento muscular fetal durante o período gestacional, podendo influenciar os mecanismos moleculares relacionados a miogênese fetal, fator especialmente importante para a progênie de porcas nulíparas. Entretanto, ainda é questionado se a suplementação desse aminoácido no terço final da gestação, período de rápido crescimento fetal, é capaz de promover alterações na miogênese dos fetos. Dessa forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação com L-arginina, durante o terço final de gestação, nos mecanismos moleculares relacionados a miogênese fetal, bem como avaliar o desenvolvimento muscular dos leitões e as características da leitegada ao nascimento. Foram utilizadas 23 fêmeas suínas nulíparas, com peso médio de 205,37 kg \pm 11,50 kg. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em duas dietas: dieta controle (CON) atendendo às exigências nutricionais de porcas em gestação ou dieta CON suplementada com 1,0% de L-arginina (ARG). As dietas experimentais foram fornecidas em quantidades iguais às 09:00h e 16:00h, totalizando 2,5 kg/dia. Aos 110 dias de gestação as porcas foram pesadas e transferidas para as gaiolas de maternidade, onde foram coletadas amostras de sangue para obtenção do soro e do plasma para análise da concentração de insulina, ureia e estradiol. Após a identificação do final do parto, por meio da expulsão das placentas, foi registrado o número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, mumificados e natimortos. Em seguida, foi realizada a pesagem das fêmeas e dos leitões para o cálculo do peso total de nascidos, peso total dos nascidos vivos, peso médio ao nascimento, desvio padrão da média, coeficiente de variação do peso ao nascimento e incidência de leitões com crescimento intrauterino retardado (CIUR, peso < 1,00 kg). O leitão com peso mais próximo do peso médio da leitegada foi insensibilizado por eletronarcose e abatido por sangramento para coleta de amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinoso*, para análise histomorfométrica e molecular. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com exceção dos dados das variáveis: nascidos totais, nascidos vivos, natimortos e mumificados, além da estratificação das classes de peso dos leitões, as quais foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado para

indicar significância estatística e valores de P entre 0,05 e 0,10 foram considerados tendência. Leitões nascidos de porcas ARG tiveram maior expressão ($P \leq 0,05$) de mRNA dos genes MyoD e MYOG e tendência ($P=0,06$) de maior expressão do gene IGF-2 no músculo *Longissimus dorsi*, em relação ao grupo CON. Entretanto, não houve diferenças ($P > 0,05$) nas variáveis histomorfométricas do músculo *Longissimus dorsi* e *Semitendinoso*. O peso total de nascidos, o peso total dos leitões nascidos vivos, o peso médio do leitão ao nascimento, o desvio padrão da média, o coeficiente de variação do peso ao nascimento e a incidência de leitões CIUR não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) em relação ao CON. Foi verificada ausência ($P \leq 0,05$) de leitões natimortos nas porcas do grupo ARG, porém não foram observadas diferenças ($P \leq 0,05$) no número de leitões nascidos totais, nascidos vivos e mumificados em relação ao grupo CON. O nível de estradiol e ureia foram superiores ($P \leq 0,05$) nas fêmeas alimentadas com ARG. A concentração de insulina não foi influenciada ($P > 0,05$) pela suplementação de L-arginina. A suplementação com 1,0% de L-arginina para porcas nulíparas, dos 85 aos 114 dias de gestação, influenciou os mecanismos moleculares relacionados à miogênese fetal, aumentando a expressão do mRNA dos fatores de reguladores miogênicos MyoD e MYOG e do IGF-2 no *Longissimus dorsi* dos leitões. Além disso, a suplementação com L-arginina resultou na não ocorrência de leitões natimortos e no aumento dos níveis plasmáticos de estradiol nas porcas.

Palavras-chave: Aminoácidos funcionais. Desenvolvimento fetal. Miogênese. Músculo esquelético.

ABSTRACT

RODRIGUES, Gustavo de Amorim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021.
L-arginine supplementation for nulliparous sows in the last trimester of gestation.
Advisor: Alysson Saraiva.

Maternal supplementation with L-arginine has been evaluated as an alternative capable of contributing to greater fetal muscle development during the gestational period, which may influence the molecular mechanisms related to fetal myogenesis, an especially important factor for the offspring of nulliparous sows. However, it is still questioned whether the supplementation of this amino acid in the last third of gestation, a period of rapid fetal growth, is capable of promoting changes in fetal myogenesis. Thus, the present study was carried out with the aim of evaluating the effects of L-arginine supplementation during the last third of gestation on molecular mechanisms related to fetal myogenesis, as well as evaluating the muscle development of piglets and litter traits at birth. Twenty-three nulliparous sows with 205.37 ± 11.50 kg of body weight were used. The animals were assigned in a completely randomized design, in two diets: control diet (CON) meeting the nutritional requirements of pregnant sows or CON supplemented with 1.0% L-arginine (ARG). The experimental diets were provided in equal amounts at 09:00h and 16:00h, totalizing 2,5 kg/day. At 110 days of gestation, the sows were weighed and transferred to individual farrowing crates, where blood samples were collected to obtain serum and plasma for analysis of insulin, urea and estradiol concentrations. After the identification of the end of farrowing, through the expulsion of the placenta, the number of total piglets born, born alive, mummified and stillborn were recorded. Then, the sows and piglets were weighed to calculate the following variables: total weight of born piglets, total weight of born alive piglets, average of piglet body weight at birth, standard deviation of the mean, within-litter variation of piglets' birth weight and the incidence of intrauterine growth retarded piglet (IUGR, weight < 1,00 kg). The piglet with body weight closest to the average of litters' piglet weight was electrically stunned followed by exsanguination to collect *Longissimus dorsi* and *Semitendinosus* muscles samples for histological and molecular analysis. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA), with the exception for the following variables: total born, born alive, stillborn, mummified and the stratifications of piglets' weight classes, which were analyzed by the Kruskal-Wallis non-parametric test. The P-value ($P \leq 0,05$) was considered to indicate statistical significance and P-values between 0.05 and 0.10 were considered as trend. Piglets

born from sows fed ARG diet had greater ($P \leq 0.05$) mRNA expression of MyoD and MYOG genes and tendency to present greater expression ($P = 0.06$) of IGF-2 gene compared to CON sows in *Longissimus dorsi* muscle. However, there were no differences ($P > 0.05$) in the histomorphometric variables of the *Longissimus dorsi* and *Semitendinosus* muscles. The total weight of born piglets, total weight of born alive piglets, average piglet body weight at birth, standard deviation of the mean, the within-litter birth weight coefficient of variation and the incidence of IUGR piglets did not differ ($P > 0.05$) compared to CON. Absence ($P \leq 0.05$) of stillborn piglets was verified in the ARG sows. There were no differences ($P \leq 0.05$) in the number of totals born, born alive and mummified piglets compared to CON. The levels of estradiol and urea were higher ($P \leq 0.05$) in ARG sows. Insulin concentration was not influenced ($P > 0.05$) by L-arginine supplementation. Supplementation of 1.0% L-arginine for nulliparous sows, from 85 to 114 days of gestation, influenced the molecular mechanisms related to fetal myogenesis, increasing the expression of mRNA of myogenic regulatory factors MyoD and MYOG and IGF-2 in *Longissimus dorsi* of piglets. In addition, ARG supplementation resulted in absence stillborn piglets and increased plasma estradiol levels in sows.

Keywords: Functional amino acids. Fetal development. Myogenesis. Skeletal muscle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das rações experimentais	26
Tabela 2 - Desenho dos <i>primers</i>	27
Tabela 3 - Dados fenotípicos de porcas alimentadas com ração CON ou ARG e dos leitões.28	
Tabela 4 - Parâmetros sanguíneos de porcas aos 110 dias de gestação alimentadas com ração CON ou ARG	28
Tabela 5 - Variáveis histomorfométricas do <i>Longissimus dorsi</i> e <i>Semitendinoso</i> de leitões recém-nascidos de porcas alimentadas com ração CON ou ARG.....	29
Tabela 6 - <i>Fold change</i> entre a suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) e ração controle (CON) de porcas a partir dos 85 dias de gestação na expressão relativa de genes do <i>Longissimus dorsi</i> dos leitões	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1	Animais, delineamento experimental e rações experimentais	11
2.2	Coleta e análise sanguínea	12
2.3	Parto e características da leitegada	12
2.4	Coleta de amostras do tecido muscular esquelético da progênie	13
2.5	Análise histomorfométrica do tecido muscular esquelético do leitão	13
2.6	Extração do RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR	14
2.7	Análise estatística	15
3	RESULTADOS	15
3.1	Ambiente térmico	15
3.2	Dados fenotípicos das porcas e dos leitões	15
3.3	Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos	15
3.4	Histomorfometria do tecido muscular esquelético do leitão.....	16
3.5	Expressão Gênica.....	16
4	DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÃO.....	20
6	AGRADECIMENTOS	20
7	REFERÊNCIAS	20
	ANEXO.....	30

1 INTRODUÇÃO

O progresso do melhoramento genético nas últimas décadas resultou na disponibilidade de porcas altamente prolíficas para o sistema de produção de suínos. No entanto, o aumento no número de leitões nascidos tem impactado negativamente a eficiência útero-placentária relacionada à distribuição de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, influenciando o desenvolvimento muscular pré-natal, resultando em leitões menos viáveis e com baixo peso ao nascimento (Père and Etienne, 2000; Bérard et al., 2010; Campos et al., 2012). Esse fator pode ser intensificado pela ordem de parto das porcas, uma vez que o número de nascidos e o peso ao nascimento da progênie de nulíparas é inferior ao de porcas múltiparas. Estas características estão associadas à fisiologia, mas principalmente com o crescimento corporal e, em particular, com o desenvolvimento do aparelho reprodutor das porcas (Knecht et al., 2015; Freking et al., 2016). Sendo assim, estudos que avaliem estratégias nutricionais para maximizar o desenvolvimento muscular pré-natal dos leitões provenientes de porcas nulíparas são necessários.

A suplementação dietética com arginina vem sendo avaliada como potencial alternativa para contribuir com o maior desenvolvimento muscular fetal dos leitões (Bérard et al., 2010; Garbossa et al., 2015; Madsen et al., 2017), uma vez que esse aminoácido é precursor de moléculas biologicamente ativas, como o óxido nítrico e as poliaminas, fatores-chave da angiogênese e do crescimento placentário (Wu et al., 2007; 2013). Além disso, estudos demonstram que os níveis fisiológicos de arginina ativam a via de sinalização da mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e a sua suplementação pode influenciar a expressão dos fatores reguladores miogênicos (MRFs) e dos fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) no músculo esquelético, os quais desempenham papéis cruciais na síntese de proteínas, proliferação, diferenciação e crescimento celular (Yao et al., 2008; Kong et al., 2012; Kalbe et al., 2013; Chen et al., 2013; Hu et al., 2019).

A miogênese em suínos ocorre de forma bifásica, em que dos 35 aos 55 dias de gestação acontece a formação das miofibras primárias e dos 55 aos 95 dias gestacionais a formação das miofibras secundárias, finalizando, assim, a hiperplasia pré-natal. Após os 95 dias de gestação, o número total de fibras musculares estará estabelecido, mas a hipertrofia e a maturação muscular continuam (Foxcroft et al., 2006). Estudos tem demonstrado que a suplementação com L-arginina, dos 14 aos 28 dias de gestação, tem afetado positivamente a miogênese fetal, promovendo maior hiperplasia das miofibras musculares primárias (Bérard et al., 2010), maior formação das miofibras secundárias (Madsen et al., 2017) e alterações

na expressão de MRFs e IGF-2 no músculo esquelético de leitões (Kalbe et al., 2013), aos 75 dias gestacionais.

No entanto, ainda se faz necessária a realização de estudos em outros períodos da gestação, como o terço final (85 aos 114 dias), uma vez que nessa fase o desenvolvimento do músculo esquelético é mais susceptível aos fatores relacionados ao ambiente uterino, além de ser o período em que o crescimento fetal aumenta exponencialmente e a taxa de deposição de proteína no feto é maior (McPerson et al., 2004; Du et al., 2015).

Dessa forma, esse estudo teve como hipótese que a suplementação com 1,0% de L-arginina na ração, dos 85 aos 114 dias de gestação, promove alterações moleculares na miogênese fetal e melhora o desenvolvimento muscular dos leitões e as características da leitegada ao nascimento.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a suplementação com L-arginina, durante o terço final de gestação nos mecanismos moleculares relacionados a miogênese fetal, bem como avaliar o desenvolvimento muscular dos leitões e as características da leitegada ao nascimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os métodos envolvendo a manipulação dos suínos seguiram os princípios éticos da pesquisa com animais (CONCEA, 2016) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa, protocolo 0109/2018.

2.1 Animais, delineamento experimental e rações experimentais

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Foram utilizadas 23 matrizes suínas híbridas comerciais, nulíparas, com peso inicial de 205,37 kg \pm 11,50 kg, alojadas em baias individuais (2,29 \times 2,17 m) dos 85 aos 110 dias de gestação e em gaiolas de maternidade (2,40 \times 0,60 m) dos 110 dias de gestação até o parto. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo 12 repetições para o tratamento controle (CON) e 11 para o tratamento L-arginina (ARG), em duas dietas: CON, formulada para atender as exigências nutricionais de porcas em gestação (Rostagno et al. 2011) ou CON suplementada com 1,0% ARG, a qual foi realizada em substituição ao caulim. O nível de 1,0% de suplementação de L-arginina foi definido com base em estudos anteriores e em sua capacidade de aumentar a concentração plasmática de arginina em porcas (Zhu et al., 2017). Com o objetivo de evitar a competição

por transportadores de aminoácidos básicos e toxicidade, buscou-se não exceder o limite de 2,0% de arginina em ambas as dietas e não ultrapassar a relação de arginina digestível com lisina digestível de 3,0 (Wu et al., 2013).

As rações (Tabela 1) foram fornecidas do 85º dia de gestação até o parto em quantidades iguais às 09:00h e 16:00h, totalizando 2,5 kg/dia. As porcas tiveram livre acesso a água durante todo o período experimental e consumiram toda a ração ofertada. A temperatura e a umidade no interior das instalações foram registradas, diariamente, por meio do dispositivo *datalogger* (Akso, São Leopoldo, Brasil).

2.2 Coleta e análise sanguínea

Aos 110 dias de gestação as fêmeas foram pesadas e amostras de sangue foram coletadas em dois tubos (Becton Dickinson Vacutainer Systems) de 10 mL, sendo um siliconado e o outro com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), para obtenção de soro e plasma, respectivamente. Uma hora após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (Eppendorf® 5702R) a 3.000 x g por 10 min a 4°C, possibilitando a retirada do soro e do plasma, os quais foram transferidos para microtubos de 1,5mL e estocados à -20°C até posteriores análises.

As amostras de soro foram utilizadas para determinação das concentrações de ureia (Ureal Cobas c 311; Roche Diagnostics GmbH, Basel, Suíça) e insulina (Kit Architect Insulina; Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). As amostras de plasma foram utilizadas para determinação da concentração de estradiol, utilizando imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (Architect estradiol assay, Abbott, Illinois, EUA).

2.3 Parto e características da leitegada

Após identificação do final do parto por meio da expulsão das placentas, foi registrado o número de leitões nascidos totais, nascidos vivos, natimortos e mumificados. Após o parto, foi realizada a pesagem da fêmea e dos leitões para cálculo de variáveis: peso total de nascidos, peso total dos nascidos vivos, peso médio ao nascimento, desvio padrão da média do peso ao nascimento, coeficiente de variação do peso médio ao nascimento e a proporção de leitões em faixas de peso, sendo elas: < 1,00 kg; 1,00 a 1,20 kg; 1,20 a 1,45 kg; 1,45 a 1,70 kg; > 1,70 kg. Leitões com peso ao nascimento menor que 1,00kg foram considerados com crescimento intrauterino retardado (CIUR).

2.4 Coleta de amostras do tecido muscular esquelético da progênie

O leitão com peso mais próximo do peso médio da leitegada foi insensibilizado por eletronarcose e abatido por sangramento para coleta de amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinoso* para análises histológica e molecular.

As amostras destinadas às análises histológicas (cortes de 2 x 3 cm) foram acondicionadas em frascos de 50 mL, com paraformaldeído a 4% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e incubadas *overnight* a temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram conservadas em etanol 70% até o processamento para a confecção dos blocos e cortes histológicos.

Para análise molecular, as amostras foram coletadas e inseridas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram transferidas para armazenamento em freezer -80°C até o processo de extração do RNA.

2.5 Análise histomorfométrica do tecido muscular esquelético do leitão

As amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinoso*, previamente fixadas e armazenadas em etanol 70%, foram cortadas transversalmente (5 x 8 mm) e submetidas à desidratação em séries crescentes de solução de etanol (80%, 90% e 100%), sendo imersas por 30 minutos em cada uma das soluções. Na sequência, as amostras foram incluídas em 2-hidroxiethyl metacrilato (Historesina® - Leica), segundo as recomendações do fabricante.

Cortes de 3 µm de espessura, foram obtidos por meio do micrótomo automático (Rotary Microtome RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Com o intuito de obter cortes representativos, foi confeccionada 1 lâmina por animal com 8 cortes semi-sequenciais por lâmina.

As lâminas foram coradas com solução de hematoxilina - eosina (HE) e montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). A leitura das lâminas foi realizada utilizando microscópio de luz (BX53; Olympus, Tokyo, Japão), no aumento de 20x, com câmera acoplada CMOS 1,3 MP BioCAM (Takachiho, Japão), onde foram registradas 8 imagens de cada tecido por animal, para determinação da proporção volumétrica dos componentes do tecido muscular e do número de fibras musculares, os quais foram mensurados utilizando o programa Image J® (version 1.50i; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). O número total de fibras musculares nos tecidos foi avaliado por contagem de cada imagem histológica (área: 0,131 mm²). A proporção volumétrica dos componentes do tecido muscular foi obtida projetando 266 intersecções (pontos) em cada imagem histológica. Pontos coincidentes foram registrados e definidos como: núcleo, sarcoplasma e tecido conjuntivo. A porcentagem de pontos para o tecido muscular foi calculada através da fórmula: Proporção

volumétrica (%) = (Número de pontos em cada estrutura / total de pontos no tecido muscular) * 100.

2.6 Extração do RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR

A extração do RNA total foi realizada a partir de 70 mg das amostras do músculo *Longissimus dorsi* dos leitões (previamente pulverizadas em nitrogênio), utilizando TRIzol[®] (InvitrogenTM) segundo as instruções do fabricante. O precipitado final foi reidratado com 30 µL de água UltraPure[®] DNase/RNase-Free. A concentração do RNA foi estimada por espectrofotometria utilizando-se o espectrofotômetro NanoVue Plus TM (GE Healthcare, Munique, Alemanha), observando-se as razões A260/A280 entre 1.8 e 2.0 como controle de pureza. A integridade do RNA extraído foi verificada usando-se gel de agarose 1%. Na sequência, as amostras foram reversamente transcritas em DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription (RT) (Promega, Madison, WI), seguindo a recomendação do fabricante.

Os *primers* para amplificação dos fragmentos dos genes alvo e endógenos foram desenhados por meio do programa PrimerQuest fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir das sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 2).

Os genes, *β-actina*, *HPRT1* e *GAPDH* foram utilizados em análises de normalização a fim de minimizar as possíveis variações quanto a quantidade de mRNA inicial e a eficiência da transcrição reversa. A escolha do gene endógeno foi baseada na eficiência de amplificação dos genes candidatos a partir do cálculo da eficiência para cada par de *primer* (nas concentrações de 100, 200 e 400 mM) por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})} - 1$, onde E é a eficiência da reação (Pfaffl et al., 2004) que, para os endógenos testados, variou de 0,94 a 1,22. Além disso, também foi usado como parâmetro o perfil das curvas de amplificação e de dissociação e a estabilidade de amplificação destes genes entre os tratamentos. Os genes endógenos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, sendo, então o gene *GAPDH* o escolhido para as análises.

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em duplicata utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR[®] Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações de PCR foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos

foram posteriormente normalizados a partir do método de delta-ct (ΔCt) com base nos valores de Ct obtidos para o gene de controle endógeno (*GAPDH*). O cálculo dos níveis relativos de expressão gênica foi desenvolvido de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001).

2.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software de domínio público R versão 3.4.3 (2017). Cada porca foi considerada como unidade experimental para análise. Os dados de parâmetros sanguíneos, histomorfométricos, expressão gênica e os fenotípicos relacionados à porca (peso aos 85 dias, peso aos 110 dias e peso ao parto) e à leitegada (peso total, peso médio, desvio padrão da média, coeficiente de variação do peso médio ao nascimento) foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os dados de nascidos totais, nascidos vivos, natimortos, mumificados e de estratificação das classes de peso dos leitões, foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, pois os resíduos não apresentaram distribuição normal de probabilidade (Shapiro-Wilk: $P \leq 0,05$). O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística e P-valores entre 0,05 e 0,10 foram considerados tendência.

3 RESULTADOS

3.1 Ambiente térmico

Durante o período experimental as temperaturas mínima e máxima registradas no interior das instalações foram de $16,0 \pm 1,7^\circ\text{C}$ e $23,4 \pm 1,9^\circ\text{C}$, respectivamente. A média mínima da umidade relativa foi de $55,3 \pm 6,5\%$ e a máxima foi de $74,8 \pm 4,6\%$. Dessa forma, de acordo com Lucy e Safranski (2017), na maior parte do tempo os animais estavam sob condições termoneutras.

3.2 Dados fenotípicos das porcas e dos leitões

Não foram observadas diferenças fenotípicas ($P > 0,05$) entre as fêmeas CON ou ARG (Tabela 3). A suplementação com L-arginina na ração das fêmeas gestantes não influenciou no número de leitões nascidos totais, nascidos vivos e mumificados ($P > 0,05$). Porém, foi constatado ($P = 0,001$) leitões natimortos no grupo CON e a ausência no grupo ARG. Além disso, não houve efeito ($P > 0,05$) da suplementação no peso médio e total da leitegada, e nem na proporção de leitões com menos de 1,0 kg e nem nas outras classes de peso: 1,0 a 1,2 kg; 1,2 a 1,45 kg, 1,45 a 1,7 kg; e maiores que 1,7 kg.

3.3 Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos

Aos 110 dias de gestação, as porcas alimentadas com ARG apresentaram maior ($P = 0,03$) concentração plasmática do hormônio estradiol, além de maior ($P = 0,03$)

concentração sorológica de ureia, em comparação com as porcas CON (Tabela 4). A concentração de insulina no soro sanguíneo não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os grupos.

3.4 Histomorfometria do tecido muscular esquelético do leitão

Nos tecidos musculares, *Longissimus dorsi* e *Semitendinoso*, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) em relação à proporção volumétrica de núcleos, citoplasma e tecido conjuntivo dos leitões nascidos de porcas suplementadas com ARG em comparação com as porcas CON (Tabela 5). Além disso, o número de células musculares dos leitões não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos em ambos os músculos analisados.

3.5 Expressão Gênica

A suplementação das porcas a partir dos 85 dias de gestação com L-arginina, não influenciou ($P>0,05$) a expressão gênica no tecido muscular de leitões para os genes mTOR e IGF-1 e os receptores IGF-1R e IGF-2R. No entanto, foi observada tendência de aumento ($P=0,06$) na expressão do gene IGF-2 (Tabela 6).

Em relação aos fatores de regulação miogênica no tecido muscular dos leitões, foi observada maior expressão dos genes MyoD ($P=0,04$) e MYOG ($P=0,003$) nos animais nascidos das porcas alimentadas com ARG. Os genes MSTN, MRF4 e MYF5 não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre os grupos CON e ARG.

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os grupos CON e ARG para a expressão dos genes referentes a proteínas de degradação: Caspase-1, Atrogin-1 e MURF-1.

4 DISCUSSÃO

Durante a miogênese dos suínos, a partir da formação das fibras secundárias, fatores como idade das porcas, ordem de parto, genótipo, eficiência placentária, vascularização na interface materno-fetal e o estado metabólico e hormonal do embrião podem afetar o desenvolvimento muscular fetal (Ashworth et al., 2001; Reynolds et al., 2005; Silva et al., 2013). Porcas nulíparas tem o sistema reprodutivo menos desenvolvido e possuem exigência de energia e proteína proporcionalmente maior que porcas múltíparas por ainda estarem em crescimento (Eissen et al. 2000). Dessa forma, a ordem de parto pode afetar a partição de nutrientes entre o tecido materno e embrionário, comprometendo a miogênese. O músculo esquelético não é prioridade durante desenvolvimento fetal e, conforme sugerido por Nissen et al. (2004), em porcas jovens, as exigências de nutrientes, ao final da gestação, para o miogênese fetal não são atendidos, resultando em comprometimento do desenvolvimento do tecido muscular, quando comparado com porcas de 3ª e 4ª ordem de parto.

O desenvolvimento muscular pré-natal é regulado por uma gama de fatores, tais como os fatores reguladores da miogênese, os MRFs (Myf5, MRF4, MyoD1 e MYOG), os fatores de crescimento semelhante à insulina, os IGFs (IGF-1 e IGF-2) e a miostatina (Braun & Gautel, 2011). Neste estudo, a suplementação materna com 1,0% de L-arginina, resultou em aumento da expressão de mRNA de MyoD e MYOG e de componentes do sistema IGF no músculo *Longissimus Dorsi* dos leitões ao nascimento. Os IGFs estão envolvidos em diferentes etapas da miogênese, seja na ativação e proliferação de células satélites ou atuando na via de regulação da síntese proteica, estimulando a hiperplasia e a hipertrofia celular (Semsarian et al., 1999; Barton et al., 1999; Grounds, 2002). Além do mais, a via do IGF pode regular as proteínas da família MRFs, principalmente o MyoD e o MYOG, controlando o processo de proliferação, diferenciação, maturação e hipertrofia das fibras musculares (Zanou et al., 2013), coerente com os resultados do presente estudo.

O terço final da gestação dos suínos é compreendido, majoritariamente, pelo processo de hipertrofia muscular, que é caracterizado pelo aumento do tamanho das fibras musculares, sendo coordenado pela via da mTOR que é mediada pelo IGF-1 (Glass, 2005). Aguiar et al. (2012) observou uma correlação positiva entre a aumento da massa muscular de camundongos com a expressão do mRNA dos genes MyoD, MYOG e IGF-1, sugerindo uma possível interação desses genes no controle da hipertrofia muscular. Entretanto, em nosso estudo, apesar de terem sido observadas diferenças numéricas, a suplementação com L-arginina não afetou a expressão do mRNA do IGF-1 e mTOR e nem a proporção sarcoplasmática dos músculos esqueléticos analisados, a qual está relacionada ao diâmetro da fibra muscular.

No entanto, os leitões das porcas alimentadas com ARG apresentaram tendência de aumento da expressão do mRNA do IGF-2. O IGF-2 é essencial para ocorrência da miogênese por estar associado, principalmente, à diferenciação muscular em embriões e fetos, sendo esse processo mediado pela via PI3K/AKT/mTOR/p70S6K (Wilson et al., 2003; Zanou et al., 2013). Estudos apontam que a expressão do IGF-2 aumenta à medida que as células musculares se tornam totalmente diferenciadas, isso pode se dar, em parte, pelo fato do MyoD promover a indução da expressão do IGF-2, após ativação da via de sinalização IGF/AKT. O MyoD, na fase de diferenciação muscular, é um potente estimulador do MYOG, cuja função é promover a fusão e diferenciação dos miócitos e maturação das miofibras, sendo mais expressa no terço médio e final da miogênese (Wilson et al., 2003; Zanou et al., 2013; Aboalola et al., 2017; Oksbjerg et al., 2017).

Assim, o aumento da expressão de mRNA do MyoD, MYOG e a tendência de aumento do mRNA do IGF-2 no músculo esquelético dos leitões das porcas ARG, sugere um período prolongado da diferenciação muscular e maior maturação das miofibras. Apesar do processo de hiperplasia cessar por volta dos 95 dias de gestação, os genes relacionados à miogênese, incluindo a formação de miofibras, podem não apresentar regulação ascendente específica no seu nível de expressão, mas podem ser expressos em níveis estacionários no nascimento (Madsen et al., 2017).

Dessa forma, os resultados desse estudo, corroboram os de Chen et al. (2013), que relataram que a suplementação com L-arginina pode aumentar a expressão de mRNA do IGF-2 no tecido muscular de leitões. Além disso, ao contrário do que foi relatado em outros estudos conduzidos no início do período gestacional (Kalbe et al., 2013; Madsen et al., 2017), a suplementação de L-arginina no terço final da gestação pode influenciar a expressão de mRNA de MyoD e MYOG, independente do peso ao nascimento dos leitões. Demonstrando que apesar dos mecanismos moleculares pelos quais a arginina regula o desenvolvimento da miofibras não serem bem definidos, o desenvolvimento muscular pode ser influenciado pelo nível nutricional desse aminoácido.

Apesar de terem sido observadas alterações moleculares na miogênese fetal, a suplementação com L-arginina, neste estudo, não influenciou o peso de nascidos totais e nascidos vivos, o peso médio do leitão e o coeficiente de variação do peso médio dos leitões ao nascimento. De forma similar, Bass et al. (2017) não observaram efeitos no desempenho reprodutivo de porcas nulíparas e primíparas alimentadas com 1,0% de L-arginina, entre os dias 93 e 110 de gestação. Além disso, também não foi observada redução na porcentagem de leitões caracterizados como CIUR (peso < 1,00 kg), sendo este resultado de acordo com o observado por Quesnel et al. (2014) e Hong et al. (2020).

O uso de porcas nulíparas no presente estudo pode explicar, em parte, o fato da arginina não ter alterado as características de desempenho reprodutivo avaliadas (Palencia et al., 2017). Grande parte dos estudos disponíveis na literatura em que são observados efeitos positivos da arginina, durante a suplementação no terço final da gestação, utilizaram porcas com ordem de parto superior a três (Wu et al., 2012; Liu et al., 2012; Nuntapaitoon et al., 2018). No entanto, os dados reprodutivos devem ser interpretados com cautela devido ao baixo número de porcas utilizadas neste estudo.

A suplementação com L-arginina, neste estudo, não resultou em aumento significativo do número de leitões nascidos vivos, entretanto, foi observado que as porcas alimentadas com ARG não apresentaram leitões natimortos, sendo esse resultado similar ao observado por Che

et al. (2013) e Nuntapaitoon et al. (2018). A arginina é um aminoácido necessário para a síntese placentária de óxido nítrico e de poliaminas, os quais estimulam não apenas a angiogênese e o crescimento vascular, mas, também, o fluxo sanguíneo útero-placentário e a transferência de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, proporcionando melhora na eficiência uterina para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos fetos (Wu et al., 2005; Kwon et al., 2004; Wu et al., 2006; Che et al., 2013).

Além disso, o aumento dos níveis plasmáticos de estradiol nas fêmeas alimentadas com a dieta ARG, pode estar relacionado à melhora na eficiência uterina. Esse hormônio é essencial para manutenção da gestação, pois está relacionado ao aumento do fluxo sanguíneo placentário, por estimular a secreção do fator de crescimento endotelial (VEGF), que tem a sua expressão aumentada progressivamente durante a gestação em suínos (Reynolds et al., 1998; Vonnahme et al., 2001). Dessa forma, o aumento dos níveis plasmáticos de estradiol se correlaciona positivamente com a taxa de desenvolvimento feto-placentária e com o crescimento fetal (Edgerton et al., 1971; Kensinger et al., 1986).

Dietas contendo altos níveis de proteína bruta e/ou maior concentração de arginina podem resultar em antagonismo na absorção de aminoácidos e em toxicidade por amônia, causando prejuízo no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas (Wu et al., 2007; Wu et al., 2016; Wu et al., 2013). No presente trabalho, apesar de ter sido observada maior concentração de ureia no soro sanguíneo dos animais ARG, esse fator não influenciou de forma negativa o desempenho reprodutivo das fêmeas. Em estudos recentes, avaliando a suplementação de L-arginina para porcas gestantes, sem a utilização do controle isonitrogênico, também não foram reportados prejuízos no desempenho reprodutivo das fêmeas (Garbossa et al., 2015; Holanda et al., 2018; Nuntapaitoon et al., 2018; Costa et al., 2019).

Com base nos resultados observados com a suplementação materna com L-arginina no presente estudo, confirma-se a hipótese de que este aminoácido, no terço final da gestação, promove alterações na miogênese fetal, conforme evidenciado pelo aumento da expressão de mRNA do MyoD, MYOG e tendência de aumento do mRNA do IGF-2 no músculo esquelético dos leitões. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a arginina afeta o desenvolvimento das fibras musculares, tanto em nível celular quanto molecular, ainda precisam ser elucidados. Por outro lado, apesar de ter sido observado ausência de natimortos nas porcas ARG, não foi confirmada a hipótese de que a suplementação com ARG melhora o desenvolvimento muscular e as características da leitegada, principalmente o peso ao nascimento dos leitões e a incidência de leitões CIUR. Ainda assim, essa estratégia nutricional pode ser benéfica, especialmente para porcas nulíparas, promovendo melhoria na taxa de

sobrevivência dos leitões, além de poder influenciar o potencial de crescimento da progênie nas fases subsequentes da produção.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com 1,0% de L-arginina para porcas nulíparas, dos 85 aos 114 dias de gestação, influenciou os mecanismos moleculares relacionados à miogênese fetal, aumentando a expressão do mRNA dos fatores reguladores miogênicos MyoD e MYOG e do IGF-2 no *Longissimus dorsi* dos leitões. Além disso, a suplementação com ARG resultou na não ocorrência de leitões natimortos e em aumento dos níveis plasmáticos de estradiol nas porcas.

6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA).

7 REFERÊNCIAS

- Aboalola, D.; Han, V. K. M. Different effects of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-2 on myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells International**, v.2017, p.1-15, 2017.
- Aguiar, A. F.; Vechetti-Júnior, I. J.; Souza, R. W. S. et al. Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. **Physiology & Biochemistry**, v.34, p.293-301, 2012.
- Ashworth, C. J.; Finch, J. M.; Page, K. R.; Nwagwu, M. O.; Mcardle, H. J. Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs. **Reproduction Supplement**, v.58, p. 233-246, 2001.
- Barton-Davis, E. R.; Shoturma, D. I.; Sweeney, H. L. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. **Acta Physiologica**, v.167, p.301–305, 1999.
- Bass, B. E.; Bradley, C. L.; Johnson, Z. B.; et al. Influence of dietary L-arginine supplementation of sows during late pregnancy on piglet birth weight and sow and litter performance during lactation. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 1, p. 248–256, 2017.

- Bérard, J.; Pardo, C. E.; Bethaz, S.; et al. Intra-uterine crowding decreases average birth weight and affects muscle fiber hyperplasia in piglets. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3242–3250, 2010.
- Braun, T.; Gautel, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, p. 349-361, 2011.
- Campos, P. H. R. F.; Silva, B. A. N.; Donzele, J. L.; et al. Effects of sow nutrition during gestation on within-litter birth weight variation: a review. **Animal**, v.6 (5), p. 797-806, 2012.
- Che, L.; Yang, P.; Fang, Z.; Lin, Y.; Wu, D. Effects of dietary arginine supplementation on reproductive performance and immunity of sows. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, n. 4, p. 167–175, 2013.
- Chen, R.; Wang, W.; Liu, S.; Pan, J.; Li, T.; Yin, Y. Dietary arginine supplementation altered expression of IGFs and IGF receptors in weaning piglets. **Journal of Cell and Animal Biology**, v.7(4), p. 44-50, 2013.
- Costa, K. A.; Saraiva, A.; Guimarães, J. D.; Marques, D. B. D.; Neves, M. M.; Barbosa, L. M. R.; et al. Dietary L-arginine supplementation during early gestation of gilts affects conceptuses development. **Theriogenology**, v.140, p.62-71, 2019.
- Du, M.; Wang, B.; Fu, X.; et al. Fetal programming in meat production. **Meat Science**, v. 109, p.40-47, 2015.
- Edgerton, L. A.; Erb, R. E. Metabolites of Progesterone and Estrogen in Domestic Sow Urine. I. Effect of Pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 3, p. 515–524, 1971.
- Eissen, J. J.; Kanis, E.; Kemp, B. Sows factors affecting voluntary feed intake during lactation. **Livestock Production Science**, v.64, p.147-165, 2000.
- Freking, B. A.; Lents, C. A.; Vallet, J. L. Selection for uterine capacity lifetime productivity of sows. **Animal Reproduction Science**, v.167, p. 16-21, 2016.
- Foxcroft, G. R.; Dixon, W. T.; Novak, S.; Putman, C. T.; Town, S. C.; Vinsky, M. D. A. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. **Journal of Animal Science**, v.84, p.105-112, 2006.
- Garbossa, C. A. P.; Júnior, F. M. C.; Silveira, H.; et al. Effects of ractopamine and arginine dietary supplementation for sows on growth performance and carcass quality of their

progenies. **Journal of Animal Science**. v. 93, p. 2872–2884, 2015.

Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p. 1974-1984, 2005.

Grounds, M. D. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signaling. **Biogerontology**, v.3, p.19–24, 2002.

Holanda, D. M.; Marcolla, C. S.; Guimarães, S. E. F.; Neves, M. M.; Hausman, G. J.; Duarte, M. S.; et al. Dietary L-arginine supplementation increased mammary gland vascularity of lactating sows. **Animal**, v.13, p.790-798, 2019.

Hong, J.; Fang, L. H.; Jeong, J. H.; Kim, Y. Y. Effects of L-Arginine supplementation during late gestation on reproductive performance, piglet uniformity, blood profiles, and milk composition in high prolific sows. **Animals**, v.10, p.1-19, 2020.

Hu, C. J.; Li, F. N.; Duan, Y. H.; et al. Dietary supplementation with arginine and glutamic acid alters the expression of amino acid transporters in skeletal muscle of growing pigs. **Amino Acids**, v.51 (9), p.1081-1092, 2019.

Kalbe, C.; Bérard, J.; Porm, M.; Rehfeldt, C.; Bee, G. Maternal L-arginine supplementation during early gestation affects foetal skeletal myogenesis in pigs. **Livestock Science**, v.157, p. 322-329, 2013.

Kensinger, R. S.; Collier, R. J.; Bazer, F. W.; Kraeling, R. R. Effect of number of conceptuses on maternal hormone concentrations in the pig. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 6, p. 1666–1674, 1 jun. 1986.

Knecht, D.; Srodon, S.; Duzinski, K. The impact of season, parity and breed on selected reproductive performance parameters of sows. **Archives Animal Breeding**, v.58, p.49-56, 2015.

Kong, X.; Tan, B.; Yin, Y.; Gao, H.; Li, X.; Jaeger, L. A.; Bazer, F. W.; Wu, G. L-Arginine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophectoderm cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.1178–1183, 2012.

Kwon H.; Wu G.; Meininger C.; Bazer F.W.; Spencer T.E. Developmental changes in nitric oxide synthesis in the ovine placenta. **Biology of Reproduction**, v.70, p.679–686, 2004.

Liu, X. D.; Wu, X.; Yin, Y. L.; Liu, Y. Q.; Geng, M. M.; Yang, H. S.; Blachier, F.; Wu, G. Y. Effects of dietary L-arginine or N-carbamylglutamate supplementation during late gestation of sows on the miR-15b/16, miR-221/222, VEGFA and eNOS expression in umbilical vein. **Amino Acids**, v.42, p.2111-2119, 2012.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p.402-408. 2001.

Lucy, M. C.; Safranski, T. J. Heat stress in pregnant sows: Thermal responses and subsequent performance of sows and their offspring. **Molecular Reproduction and Development**, v.84, p.946-56, 2017.

Madsen, J. G.; Pardo, C.; Kreuzer, M.; Beel, G. Impact of dietary L-arginine supply during early gestation on myofiber development in newborn pigs exposed to intra-uterine crowding. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.8:58, p.01-12, 2017.

McPherson, R. L.; Ji, F.; Wu, G.; et al. Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 9, p. 2534–2540, 2004.

Nissen, P.; Jorgensen, P. F.; Oksbjerg, N. Within-litter variation in muscle fiber characteristics, pig performance, and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.82, p.414–421, 2004.

Nuntapaitoon, M.; Muns, R.; Theil, P. K.; Tummaruk, P. L-arginine supplementation in sow diet during late gestation decrease stillborn piglet, increase piglet birth weight and increase immunoglobulin G concentration in colostrum. **Theriogenology**, v. 121, p. 27–34, nov. 2018.

Oksbjerg, N.; Therkildsen, M. Chapter 3 – Myogenesis and muscle growth and meat quality A2, in *New Aspects of Meat Quality*, ed. by Purslow PP. **Woodhead Publishing**, p. 33–62. 2017.

Palencia, J. Y. P.; Lemes, M. A. G.; Garbossa, C. A. P.; Abreu, M. L. T.; Pereira, L. J.; Zangeronimo, M. G. Arginine for gestating sows and foetal development: A systematic review. **Journal of Physiology and Animal Nutrition**, v.102, p.204-213, 2017.

Père, M. C.; Etienn, M. Uterine blood flow in sows: Effects of pregnancy stage and litter size. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, p. 369–382. 2000.

- Pfaffl, M. W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, v.26, p.509-515, 2004.
- Quesnel, H.; Quiniou, N.; Roy, H.; Lottin, A.; Boulot, S.; Gondret, F. Supplying dextrose before insemination and L-arginine during the last third of pregnancy in sow diets: Effects on within-litter variation of piglet birth weight. **Journal of Animal Science**, v.92, p.1445-1450, 2014.
- Reynolds, L. P.; Kirsch, J. D.; Kraft, K. C.; Redmer, D. A. Time-course of the uterine response to estradiol-17b in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. **Biology of Reproduction**, v.59, p.613–620, 1998.
- Reynolds, L. P.; Borowicz, P. P.; Vonnahme, K. A.; Johnson, M. L.; Grazul-Bilska, A. T.; Wallace, J. M.; Caton, J. S.; Redmer, D. A. Animal models of placental angiogenesis. **Placenta**, v.26, p.689-708, 2005.
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; De Oliveira, R. F. M.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 251p. 2011.
- Semsarian, C.; Sutrave, P.; Richmond, D. R.; Graham, R. M. Insulin-like growth factor (IGF-I) induces myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal-muscle cell model. **Biochemical Journal**, v.339, p.443–451, 1999.
- Silva, A.; Dalto, D.; Lozano, A.; et al. Differences in muscle characteristics of piglets related to the sow parity. **Canadian Journal of Animal Science**, v.93, p. 471-475, 2013.
- Vonnahme, K. A.; Wilson, M. E.; Ford, S. P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1821-1825, 2001.
- Wilson, E. M.; Hsieh, M. M.; Rotwein, P. Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD stimulated myocyte maturation. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.41109–41113, 2003.
- Wu G.; Bazer F.W.; Hu J.; Johnson G.A.; Spencer T.E. Polyamine synthesis from proline in the developing porcine placenta. **Biology of Reproduction**, v.72, p.842–850, 2005.

- Wu, G.; Bazer, F. W.; Wallace, J. M.; Spencer, T. E. Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2316–2337, 1 set. 2006.
- Wu, G.; Bazer, F. W.; Davis, T. A.; et al. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. **Livestock Science**, v. 112, n. 1–2, p. 8–22, out. 2007.
- Wu, G.; Bazer, F. W.; Cudd, T. A.; Jobgen, W. S.; Kim, S. W.; Lassala, A.; Li, P.; Matis, J. H.; Meininger, C. J.; Spencer, T. E. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1673-1680, 2007.
- Wu, X.; Yin, Y. L.; Liu, Y. Q.; Liu, X. D.; Liu, Z. Q.; Li, T. J.; Huang, R. L.; Deng, Z. Y. Effect of dietary arginine and *N*-carbamoylglutamate supplementation on reproduction and gene expression of eNOS, VEGFA and PIGF1 in placenta in late pregnancy of sows. **Animal Reproduction Science**, v.132, p187-192, 2012.
- Wu, G. Y.; Bazer, F. W.; Satterfield, M. C.; Li, X. L.; Wang, X. Q.; Johnson, G. A.; Burghardt, R. C.; Dai, Z.; Wang, J.; Wu, Z. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. **Amino Acids**, v.45, p.241-256, 2013.
- Wu, Z.; Hou, Y.; Hu, S.; Bazer, F. W.; Meininger, C. J.; McNeal, C. J. Wu, G. Catabolism and safety of supplemental L-arginine in animals. **Amino Acids**, v.48, p.1541-1552, 2016.
- Yao, K.; Yin, Y. L.; Chu, W.; Liu, Z.; Deng, D.; Li, T.; Huang, R.; Zhang, J.; Tan, B.; Wang, W.; Wu, G. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. **Journal of Nutrition**, v.138, p.867–872, 2008.
- Zanou, N.; Gailly, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.70, p.4117-4130, 2013.
- Zhu, C.; Guo, C.; Gao, K.; et al. Dietary arginine supplementation in multiparous sows during lactation improves the weight gain of suckling piglets. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, p. 648–655, 2017.

TABELAS

Tabela 1 - Composição das rações experimentais

Ingredientes, %	CON	ARG
Milho (7,88%)	67,58	67,58
Farelo de soja (45,0%)	16,00	16,00
Farelo de trigo	12,00	12,00
Fosfato bicálcico	1,40	1,40
Caulim	1,00	-
L-arginina (98,0%)	-	1,00
Calcário	0,750	0,750
Sal comum	0,340	0,340
L-lisina HCL (78,0%)	0,215	0,215
Mistura mineral ¹	0,200	0,200
Cloreto de colina	0,120	0,120
Mistura vitamínica ²	0,300	0,300
L-treonina (98,5%)	0,100	0,100
Composição nutricional calculada³		
Arginina digestível (%)	0,852	1,817
Cálcio (%)	0,700	0,700
Energia metabolizável (kcal/kg)	3145	3145
Fósforo disponível (%)	0,375	0,375
Lisina digestível (%)	0,749	0,749
Metionina + cistina digestível (%)	0,412	0,412
Proteína bruta (%)	14,73	17,00
Sódio (%)	0,154	0,154
Treonina digestível (%)	0,554	0,554
Triptofano digestível (%)	0,148	0,148

¹Conteúdo/kg de produto: Zinco (50g), ferro (40g), manganês (10g), cobre (5000mg), selênio (150mg), iodo (141mg), cromo (100mg).

²Conteúdo/kg de produto: Vitamina A (1000000UI), vitamina D3 (1400000UI), vitamina E (30000mg), vitamina K3 (2800mg), vitamina B1 (1800mg), vitamina B2 (5600mg), vitamina B6 (1600mg), vitamina B12 (18000mcg), pantotenato de cálcio (20g), niacina (30g), ácido fólico (1000mg), biotina (240mg), selênio (200mg), BHT (5000mg).

³ Valores calculados de acordo com Rostagno et al. (2011).

Tabela 2 - Desenho dos *primers*

Gene	Número de acesso	Sequência	Tamanho, bp
<i>IGF-1</i>	NM_214256.1	F: GAGGCTGGAGATGTA R: TCCTGAACTCCCTCTACTTG	223
<i>IGF-1 R</i>	NM_214172.1	F: ATCTGATCATCGCCCTACC R: CCCAGCCTGCTGTTATTC	163
<i>IGF - 2</i>	NM_213883.2	F: TCTCTGTACCCTTCTGTCTG R: AGAGACTAGCCTGACATGG	212
<i>IGF - 2 R</i>	NM_001244473.1	F: CATCGGGAAGACCTTTGTG R: GCTCTTTCGTCTCGGTTTC	180
<i>MyoD</i>	GU249575.1	F: ACAGCGGACGACTTCTATG R: GAGTGTCCTCGGGCTTTA	196
<i>MSTN</i>	NM_214435.2	F: GCTGTACTCCCACAAAGATG R: CACCCACAGCGATCTACTA	175
<i>MYOG</i>	NM_001012406.1	F: GGGCATGTAAGGTGTGTAAG R: CCTCAAAGGCCTCATTAC	203
<i>MRF4</i>	DQ139775.1	F: CGCCATCAACTACATCGAGAGGT R: ATCACGAGCCCCCTGGAAT	193
<i>MYF5</i>	NM_001278775.1	F: TAGTTCCAGGCTCATCTACC R: CCTCCTTCCTCCTGTGTAA	181
<i>CASP3</i>	NM_214131.1	F: GAGGCACAGAATTGGACTG R: CAAGAAGTCTGCCTCAACTG	167
<i>Atrogin-1</i>	NM_001044588	F: TCACAGCTCACATCCCTGAG R: GACTTGCCGACTCTCTGGAC	206
<i>MuRF1</i>	NM_001184756	F: ATGGAGAACCTGGAGAAGCA R: ACGGTCCATGATCACCTCAT	158
<i>mTOR</i>	XM_003127584.6	F: GCGATAGACACCCATCTAACC R: CTTCTCTCTGGTCATAGCAACC	220
<i>ACTB</i>	XM_003124280.3	F: CTTCTAGGCGGACTGTTAGTG R: TGTCGGCGATGCCTGGGTA	123
<i>HPRT1</i>	NM_001032376.2	F: CCAGTCAACGGGCGATATAA R: GACCAAGGAAAGCAAGGTTG	165
<i>GAPDH</i>	NM_001206359.1	F: CAAAGTGGACATTGTGCGCCATCA R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT	210

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; IGF-1R: Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; IGF-2: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2; IGF-2R: Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2; MyoD: Fator de diferenciação miogênica; MSTN: Miostatina; MYOG: Miogenina; MRF4: Fator regulador da miogênese 4; mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos; CASP3: Caspase 3; Atrogin-1 e MuRF1: Ubiquitina ligases E3; ACTB: Beta-actina; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; HPRT1: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1. F e R indicam primers forward e reverse, respectivamente.

Tabela 3 - Dados fenotípicos de porcas alimentadas com ração CON ou ARG e dos leitões

Itens	CON	ARG	EPM	P-valor
<i>Peso Porca (kg)</i>				
Aos 85 d	204,87	205,91	2,344	0,835
Aos 110 d	228,46	227,30	2,565	0,805
Ao parto	202,32	206,27	2,604	0,299
<i>Características da leitegada</i>				
Nascidos totais [†]	14,33	13,18	0,656	0,458
Nascidos vivos [†]	13,50	13,18	0,621	0,877
Natimortos [†]	0,83	0,00	0,138	0,001
Mumificados [†]	0,50	0,18	0,149	0,377
Peso total nascidos, kg*	20,49	18,77	0,731	0,452
Peso total nascidos vivos, kg*	19,67	18,77	0,959	0,545
Peso médio do leitão, kg*	1,51	1,46	0,005	0,285
Desvio Padrão*	0,25	0,23	0,0007	0,477
CV*	18,36	16,60	2,548	0,364
<i>Distribuição dos leitões em classes de peso (%)</i>				
<1,0 kg [†]	52,63	47,37	0,345	0,921
1,0 a 1,2 kg [†]	51,28	48,72	0,354	0,774
1,2 a 1,45 kg [†]	59,09	40,91	0,798	0,214
1,45 a 1,7 kg [†]	50,00	50,00	0,762	0,779
>1,7 kg [†]	55,88	44,12	0,616	0,799

*Nº total de nascidos vivos foi utilizado como covariável.

[†]Variáveis analisadas pelo método não paramétrico devido à ausência de normalidade e/ou homogeneidade de variâncias; CV: Coeficiente de variação do peso médio ao nascimento; CON: Dieta controle; ARG: Dieta suplementada com 1,0% de L-arginina; EPM: Erro padrão da média.

Tabela 4 - Parâmetros sanguíneos de porcas aos 110 dias de gestação alimentadas com ração CON ou ARG

Itens	CON	ARG	EPM	P-valor
Ureia (mg/dL)	21,83	25,28	2,652	0,030
Estradiol (pg/mL)	517,67	638,36	28,99	0,035
Insulina (UI/mL)	4,35	5,17	1,359	0,446

CON: Dieta controle; ARG: Dieta suplementada com 1,0% de L-arginina; EPM: Erro padrão da média.

Tabela 5 - Variáveis histomorfométricas do *Longissimus dorsi* e *Semitendinoso* de leitões recém-nascidos de porcas alimentadas com ração CON ou ARG

Itens	CON	ARG	EPM	P-valor
<i>Longissimus dorsi</i>				
Núcleo (%)	19,17	20,30	0,520	0,286
Sarcoplasma (%)	33,64	32,86	0,839	0,653
T. conjuntivo (%)	47,19	46,84	0,820	0,835
Nº de células (0,131 mm ²)	134,20	141,06	3,448	0,332
<i>Semitendinoso</i>				
Núcleo (%)	22,08	21,85	0,473	0,823
Sarcoplasma (%)	30,81	30,50	0,601	0,804
T. conjuntivo (%)	47,11	47,65	0,516	0,528
Nº de células (0,131 mm ²)	136,95	131,65	2,880	0,370

CON: Dieta controle; ARG: Dieta suplementada com 1,0% de L-arginina; EPM: Erro padrão da média.

Tabela 6 - *Fold change* entre a suplementação com 1,0% de L-arginina (ARG) e ração controle (CON) de porcas a partir dos 85 dias de gestação na expressão relativa de genes do *Longissimus dorsi* dos leitões

Itens	CON	ARG	EPM	P-valor
mTOR	1,10	1,31	0,025	0,130
IGF-1	1,26	1,39	0,033	0,453
IGF-2	1,49	1,84	0,038	0,062
IGF-1R	1,60	1,63	0,063	0,868
IGF-2R	1,35	1,46	0,028	0,508
MyoD	1,19	1,44	0,017	0,043
MSTN	2,02	1,92	0,011	0,752
MRF4	2,00	1,94	0,070	0,782
MYOG	0,78	1,08	0,009	0,003
MYF5	1,08	1,01	0,017	0,570
Caspase	1,37	1,34	0,024	0,866
Atrogina	2,57	2,52	0,366	0,921
MURF	1,88	1,75	0,067	0,613

CON: Dieta controle; ARG: Dieta suplementada com 1,0% de L-arginina; EPM: Erro padrão da média.

ANEXO



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

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3273 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 30 de novembro de 2018

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Suplementação com L-arginina no terço final de gestação de fêmeas suínas**", protocolo n° **0109/2018**, sob a responsabilidade de **Alysson Saraiva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **30 de Nov. de 2018**.

Finalidade: **Pesquisa** **Ensino**

Vigência do Projeto: de **30 de Nov. de 2018** a **28 de Fev. de 2019**

Espécie/linhagem: **Suíno (Sus scrofa domesticus)** N° de animais: **24**

Peso: **150 Kg** Idade: **9 meses +/- 13 dias** Sexo: **Fêmea** Origem: **Setor de Suinocultura/DZO/UFV -**

CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Supplementation of L-arginine during late gestation of pregnant sows**", protocol n° **0109/2018**, under the responsibility of **Alysson Saraiva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law n°. 11.794, of October 8, 2008, Decree n°. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Nov, 30th, 2018**.

Finality: **Research** **Education**

Duration of the Project: from **Nov, 30th, 2018** to **Feb, 28th, 2019**.

Species / strain: **Swine (Sus scrofa domesticus)** N° of animals: **24**

Weight: **150 Kg** Age: **9 months +/- 13 days** Sex: **Female** Source: **Setor de Suinocultura/DZO/UFV -**

CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

Luciana Navajas Rennó
 Coordenadora da CEUAP/UFV