

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE
POEDEIRAS COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS

Autora: Ana Paula Pereira
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami

MARINGÁ,
Estado do Paraná
Fevereiro de 2014

ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS

Autora: Ana Paula Pereira
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ,
Estado do Paraná
Fevereiro de 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P436a Pereira, Ana Paula
Ácido l-glutâmico na alimentação de poedeiras comerciais com 63 a 69 semanas/ . -- Maringá, 2014. 56 f. il. : figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Produção Animal, 2014.

1. Suplementação de ácido l-glutâmico. 2. Nutrição de poedeiras. 3. Fragilidade óssea. 5. Tibiotarso. 6. PCNA - Intestino. I. Santos, Tatiana Carlesso dos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Área de Concentração Produção Animal. IV. Título.

CDD 22. ED.636.5142
JLM001635



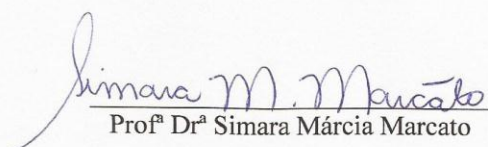
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE
POEDEIRAS COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS**

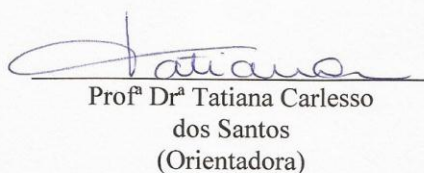
Autora: Ana Paula Pereira
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Tatiana Carlesso dos Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.


Prof^ª Dr^ª Simara Márcia Marcato


Prof^ª Dr^ª Elis Regina de Moraes
Garcia


Prof^ª Dr^ª Tatiana Carlesso
dos Santos
(Orientadora)

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça"

Cora Coralina

À Santíssima Trindade pelo Dom da Vida e por ser minha Fortaleza.

À Nossa Senhora das Graças, para quem tanto pedi e por sua intercessão tantas graças recebi.

Aos meus Pais e irmão, Iracedes, José Roberto e Paulo Henrique, por todo amor, incentivo, dedicação e por acreditarem em mim sempre.

Ao meu marido Rodrigo, pelo amor, companheirismo, compreensão, incentivo e por sempre acreditar em mim.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha família, meu marido, meus pais e meu irmão, Rodrigo, Iracedes e José Roberto e Paulo Henrique, por todo amor, incentivo, dedicação e por acreditarem em mim sempre.

Aos meus irmãos do Grupo de Oração Sagrada Família, Marcos Bueno, Josiane, Jaqueline, Andressa e Mariana por todas as orações e apoio.

Aos amigos da Pós, em especial à Catarina, Cleverson, Janaína, Isabela, Dener e Guilherme, por tanto me ajudarem, sem vocês eu não teria conseguido.

Aos amigos do trabalho, em especial a Luís Ferraz, pela compreensão, paciência e apoio em todos os momentos, em especial nos momentos finais do Mestrado.

À minha Orientadora Prof.^a Tatiana e à minha Coorientadora Prof.^a Alice, pelos ensinamentos, paciência e apoio, meu muito obrigado sempre. Aprendi muito com vocês.

Aos Secretários do PPZ e DZO Denilson, Bete e Francisco, por sempre estarem à disposição para ajudar.

Aos Funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, por todo o auxílio durante a condução do experimento, em especial ao Sr. Valentin.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, por todo conhecimento transmitido, em especial aos Professores Elias e Carlos, por me auxiliar com a parte estatística deste trabalho.

Aos Funcionários dos Laboratórios do Departamento de Zootecnia, por toda ajuda, em especial à Cleuza e à Creusa.

Meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

ANA PAULA PEREIRA, filha de José Roberto Pereira e Iracedes Aparecida Ratão Pereira, nasceu em Birigui, São Paulo, no dia 25 de maio de 1982.

Em fevereiro de 2006 concluiu o Curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Em 2009, matriculou-se no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em caráter de aluna não regular, entrando como aula regular em 2011, nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de nutrição de não ruminantes.

No mês de fevereiro de 2014, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I – INTRODUÇÃO	01
1.1 Estrutura óssea de poedeiras.....	04
1.2 Dinâmica óssea em poedeiras.....	08
1.3 Ácido L-Glutâmico e metabolismo ósseo.....	11
1.4 Ácido L-Glutâmico e intestino.....	16
1.5 Referências bibliográficas.....	19
II – OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.1 Objetivos específicos.....	25
III - ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS.....	26
Resumo.....	26
Abstract	27
Introdução	28
Material e métodos	30
Resultados e discussão	40
Conclusões	53
Referências	53
IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS	56

LISTA DE TABELAS

Página

**III - ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS
COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS**

Tabela 1. Composição percentual e níveis nutricionais da ração experimental base.....31

Tabela 2. Valores médios de desempenho produtivo e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais no período de 53 a 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.....41

Tabela 3. Análise da qualidade óssea de Tíbiotarsos de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.....43

Tabela 4. Valores médios de enzimas sanguíneas e íons circulantes de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu e do horário de coleta.....45

Tabela 5. Valores médios de qualidade intestinal de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.....48

LISTA DE FIGURAS

Página

III - ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS

Figura 1 – Comportamento do percentual de cálcio na casca de ovos de poedeiras comerciais no período de 53 a 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido L-glutâmico.....	42
Figura 2a– Índice de Seedor de Tíbiotarsos de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido L-glutâmico.....	44
Figura 2b – Índice de Robustez de tíbiotarsos de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido L-glutâmico.....	48
Figura 3 – Profundidade de Cripta de jejuno de poedeiras de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido L-glutâmico.....	51
Figura 4. Jejuno de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido l-glutâmico.	52
Figura 5. Jejuno de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido l-glutâmico . Corte transversal da cripta (cri) do jejuno com núcleos marcados para PCNA.....	50

RESUMO

O efeito da suplementação de ácido L- glutâmico (Glu) na dieta de poedeiras com 53 a 69 semanas de idade foi avaliado sobre desempenho produtivo, na qualidade óssea, no perfil sérico de enzimas e íons circulantes, na histomorfometria e na atividade proliferativa no jejuno. Foram utilizadas 240 poedeiras leves da linhagem Hi-Lyne W36 foram avaliadas por 4 ciclos de produção de 28 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, seis repetições e oito aves por unidade experimental para as variáveis produtivas e ósseas. Para as variáveis sanguíneas foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, tipo fatorial, contendo cinco níveis de Glu e 3 horários de coleta (16h00, 03h00 e 12h00). Os tratamentos consistiram na ração referência (T1, Glu calculado 2,679%) e mais quatro tratamentos com adição de Glu: T2 (T1 + 0,2 % Glu); T3 (T1 + 0,4% Glu); T4 (T1 + 0,6 % Glu) e T5 (T1 + 0,8% Glu). Na análise dos resultados, não houve efeito ($P > 0,05$) da adição de Glu para variáveis de desempenho produtivo e qualidade do ovo, com exceção da percentagem de cálcio na casca que aumentou de forma linear ($P < 0,05$) ($Y = 29,6221 + 2,0046X - R^2 = 0,87$). Na análise da Tibiotarso, a adição de Glu teve efeito significativo ($P > 0,05$) para Índice de Seedor e Robustez, ($Y = 89,754 - 7,777X - R^2 = 0,92$) e ($Y = 47,211 + 2,592X - R^2 = 0,93$), respectivamente. Não houve efeito da adição de Glu para as concentrações de cálcio, fósforo e fosfatases ácida e alcalina ou interação entre os níveis de Glu e o horário da coleta do soro sanguíneo. Os íons circulantes cálcio (iônico e total) e fósforo às 03h não diferiram das 16h e foram maiores que às 12h. Para a análise histomorfométrica do jejuno a profundidade de cripta teve efeito quadrático negativo ($P < 0,05$) ($Y = 2170,466 - 1284,890 x + 203,987 x^2$), com ponto de inflexão com 3,149% de Glu. Na análise imunohistoquímica para células em proliferação marcadas para PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), observou-se qualitativamente que em todos

os tratamentos houve atividade proliferativa nas células das criptas e na base dos vilos do jejuno, e que os tratamentos com maiores níveis de Glu apresentaram maior proporção e maior atividade proliferativa dos vilos do jejuno, incluindo a extremidade dos vilos. A adição de Glu influenciou na quantidade de cálcio na casca, na estrutura da Tíbiotarso e na atividade proliferativa do jejuno das poedeiras com 69 semanas e pode representar uma alternativa para melhoria do sistema ósseo em poedeiras.

Palavras-chave: cálcio, glutamato, ovo, PCNA, tíbiotarso.

ABSTRACT

The effect of supplemental L- glutamic acid (Glu) in the diet of laying hens with 53 to 69 weeks of age was evaluated on growth performance, bone quality, serum enzymes and circulating ions profile, histomorphometry and proliferative activity in the jejunum. 240 laying hens from Hi- Lyne W36 strain were used and evaluated by four production cycles of 28 days. The experimental design was completely randomized with 5 treatments, 6 replicates and 8 birds per experimental unit for productive and bone variables. For blood variables were used a completely randomized design, factorial , with 5 levels of Glu and 3 collection times (16h00, 12h00 and 3h00). The treatments consisted of the basal diet (T1 , Glu calculated at 2.679 %) and four treatments with the Glu addition: T2 (T1 + 0.2 % Glu); T3 (T1 + Glu 0.4%); T4 (T1 + 0.6 % Glu) and T5 (T1 + 0.8 % Glu). Analyzing the results, there was no effect ($P > 0.05$) of the Glu addition for productive performance and egg quality, with the exception of the calcium percentage in the shell that increased linearly ($P < 0.05$) ($Y = 29.6221 + 2.0046 X - R^2 = 0.87$). In the analysis of the tibiotarsus, the Glu addition had significant effect ($P > 0.05$) for Seedor and Robustness Index ($Y = 89.754 - 7.777 X - R^2 = 0.92$) and ($Y = 47.211 + 2.592 X - R^2 = 0.93$), respectively. There was no effect of the Glu addition for concentrations of calcium, phosphorus and acid and alkaline phosphatases or interaction between the Glu levels and time of collection of the blood serum. Circulating calcium ions (ionic and total) and phosphorus at 3h00 did not differ from 16h00 and were higher than 12h00. For histomorphometric analysis of the jejunum crypt depth had a negative quadratic effect ($P < 0.05$) ($Y = 2170.466 - 1284.890 x 203.987 + X^2$), with inflection point with 3.149 % of Glu. In immunohistochemical analysis for proliferating cells

labeled for PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), it was observed qualitatively that all treatments had proliferative activity on cells in the base of the crypts and villi of the jejunum, and the treatments with higher Glu levels presented a higher proportion and higher proliferative activity of the villi of the jejunum, including the tip of the villi. The Glu addition influenced the amount of calcium in the shell, the structure of the tibiotarsus and the proliferative activity of the jejunum of laying with 69 weeks and can be an alternative for improving the bone system layers.

Key words: calcium, egg, glutamate, PCNA, tibiotarsus.

I. INTRODUÇÃO

No cenário atual da produção de ovos, a busca por maior produtividade, tem levado a pesquisas que busquem a melhoria do bem-estar dos animais que são criados em gaiolas. O mercado de postura comercial no Brasil vem crescendo. Em 2012, a produção total de ovos foi de aproximadamente 32 milhões de toneladas, sendo 99% deste volume dedicado ao mercado interno e 1% ao mercado externo (UBABEF, 2013).

As exportações brasileiras de ovos somaram 26,8 mil toneladas em 2012, representando o aumento de 61,2% em relação a 2011. A receita cambial de US\$ 42,6 milhões teve um incremento de 50,8% (UBABEF, 2013).

O consumo *per capita* de ovos em 2012 foi de 161,53 ovos/ano, sendo superior em 7,85% quando comparado ao mesmo período em 2010. Estes números indicam aumento significativo no consumo de ovos pela população, indicando da mesma forma, a necessidade de aumento de produção e o desenvolvimento de pesquisas que visem o aperfeiçoamento da produção e o incremento do bem-estar das aves.

Há preocupação crescente com a condição física das poedeiras, que se mantêm por longo período dentro destas gaiolas. Linhagens cada vez mais produtivas e mais precoces vêm sendo desenvolvidas por Empresas de Genética e com elas, problemas que necessitam ser solucionados, como por exemplo, a osteoporose, distúrbio ósseo ocorrendo diminuição progressiva da estrutura mineralizada dos ossos e atacando grande parte das aves em produção e em fim de ciclo (Withehead, 2004).

Desde 1930, várias causas das deformidades do esqueleto em aves têm sido identificadas, entre os fatores que podem contribuir podemos citar: nutrientes, genética, micotoxícoses, além de práticas de manejo que afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento do esqueleto (Cook, 2000).

Particularmente nas poedeiras, a osteoporose envolve perda óssea e foi descrita primeiramente em poedeiras confinadas em gaiolas por Couch (1955) citado por Withehead (2000), que mencionou o problema, como sendo originado de ossos frágeis, paralisia e morte. A perda do tecido ósseo é exacerbada pelas gaiolas, embora, o ambiente não seja suficiente para prevenir ou reverter a fragilidade óssea (Beck e Hansen 2003).

A descoberta de desordens ósseas, como a osteoporose, que afetam a produção e o bem-estar de poedeiras tem estimulado o interesse na biologia óssea desses animais (Withehead, 2004). Se for levado em conta que uma poedeira poderia produzir até a idade de 80 a 90 semanas, e que a mesma, muitas vezes é descartada anterior a este período, pode-se verificar que muito se perde com o descarte precoce destes animais.

O aparecimento da osteoporose ou fragilidade óssea em poedeiras de alto desempenho tem sido atribuído a dois fatores; o primeiro, ao confinamento, que acarreta osteoporose por desuso, ou seja, há uma perda considerável de massa óssea e em segundo, a seleção genética moderna que têm produzido animais cada vez mais leves com baixa capacidade de consumo de alimentos, porém com alta produção, objetivando melhor conversão alimentar (Withehead e Fleming, 2000).

A debilidade óssea da poedeira acarreta queda na produção, levando os animais a apresentarem quadro de fadiga de gaiola ou até mesmo, óbito. Esta debilidade promove além da queda de desempenho, sofrimento às aves e consequentemente, perdas econômicas, quando no descarte das mesmas, uma vez que, há geração de receita com a comercialização de poedeiras em fim de ciclo.

A incidência de ossos quebrados em aves no final do período produtivo é um problema sério na indústria avícola. Em estudo realizado no Reino Unido, verificaram que 29% das aves tinham ossos quebrados, quando o lote foi descartado no final do período de produção, no momento da apanha das aves, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores pela presença de ossos quebrados no interior da carne (Riczu *et al.* 2004).

De modo geral, aves mais resistentes à osteoporose depositam menos cálcio nas cascas dos ovos, uma vez que, estes animais não mobilizam cálcio ósseo suficiente para formação da casca, quando em privação de cálcio via dieta (Bishop, 2000).

No metabolismo de aves, além dos aminoácidos essenciais, o suprimento em dietas de aminoácidos purificados de fonte de nitrogênio não específico é necessário para a síntese dos aminoácidos não essenciais e outros compostos nitrogenados (Silva, 2001).

Nos últimos anos, estudos do metabolismo ósseo, principalmente relacionado a problemas metabólicos humanos, como a osteoporose, têm sido realizados destacando um papel fisiológico do ácido l-glutâmico (Glu), no controle de atividades de células ósseas como osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Estes estudos têm demonstrado a possibilidade do Glu ser, além de precursor de proteínas do tipo Gla, ue contém resíduos do aminoácido γ -carboxiglutâmico denominadas Gla-proteínas Moraes *et al.* (2010), como a osteocalcina, um dos fatores endógenos parácrinos (autócrino), usados para comunicação intracelular nas células ósseas (Mason *et al.* 1997).

Além do papel no metabolismo ósseo, o Glu é um aminoácido não essencial, convertido no organismo em Glutamina (Gln) através da ação da enzima l-glutamina sintetase. Desempenha papel fundamental na promoção da saúde intestinal, uma vez que é o precursor obrigatório para síntese de Gln (Neame *et al.* 1957) e síntese de glutatona na mucosa intestinal (Canas *et al.* 1957) que desempenha um papel importante na manutenção da mucosa contra agentes tóxicos e produtores de peróxidos.

De acordo com Wu (2009); a glutamina e glutamato podem ser convertidos um no outro em diferentes órgãos, tais como intestino, fígado e rim e ambos estão relacionados com o desenvolvimento de trato gastrointestinal de frangos e poedeiras. Atenção especial tem sido dada à glutamina, que é distribuída para a mucosa do intestino delgado, através do sistema sanguíneo. No entanto, Reeds *et al.* (2000) propuseram que o glutamato é o substrato mais importante para o desenvolvimento do trato gastrointestinal.

O ácido L-glutâmico tem sido estudado em frangos de corte com o objetivo de melhorar a estrutura óssea, pelo rápido crescimento e ganho de peso que estas aves apresentam. Em poedeiras, não há literatura disponível sobre uso de ácido L-glutâmico e sua influência na qualidade óssea. Este tem sido considerado eficiente fonte de nitrogênio não específico para promover o desenvolvimento ósseo de pintos e para reduzir a incidência de anomalias de pernas, quando fornecido em alto nível na dieta (Moraes *et al.*1984).

Um crescente interesse da indústria a respeito da qualidade óssea e bem-estar de poedeiras têm sido observados atualmente, o que abre campo para pesquisas nesta área, com o objetivo de aliar bem-estar a maior produtividade.

1.1 Estrutura Óssea de Poedeiras

De forma geral, os ossos são compostos por dois principais constituintes, sendo, uma matriz orgânica e uma matriz inorgânica. Aproximadamente 90 % da matriz orgânica é formada por colágeno, uma proteína fibrosa helicoidal tripla, que forma a estrutura dos tecidos, promovendo suporte para o processo de mineralização. Além do colágeno, os outros 10 a 15 % da matriz orgânica são proteoglicanas, lipídeos e proteínas não colagenosas, como osteocalcina, osteonectina e osteopontinas (Whitehead e Fleming, 2000).

As matrizes não colagenosas contribuem para uma variedade de funções ósseas como estabilização da matriz, calcificação e outras atividades metabólicas regulatórias. O colágeno, por causa do arranjo de suas fibras, contribui para a resistência tensora dos ossos, promovendo um suporte orientado para a matriz mineral. Já a matriz inorgânica, ou mineral, é constituída, principalmente, por cálcio e fósforo, sob a forma de hidroxiapatita, que constitui cerca de 60 a 70 % do peso ósseo e promove sustentação e força ao osso (Rath *et al.* 2000).

Nos tecidos ósseos, dois tipos distintos de células são conhecidos por coordenadamente, regular a formação e manutenção da formação óssea, sendo, os osteoblastos, responsáveis formação óssea e os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (Harada, 2003). Estes elementos celulares são responsáveis pela síntese da matriz óssea e mineralização, são determinantes para os fatores químicos, geométricos e resistência do osso.

Os osteoblastos sintetizam a matriz óssea que é uma substância de base, rica em colágeno (principalmente tipo I) e essencial para a posterior mineralização, por aderência, de cristais de hidroxiapatita de cálcio, magnésio, potássio, sódio e carbonato e fibrilas de colágeno, individualmente (Fernandes, 2005). Durante a esqueletogênese embriogênica, estas células participam de dois modos distintos no desenvolvimento ósseo, que são ossificação intramembranar e ossificação endocondral (Hinoi *et al.* 2004).

Os osteoclastos apresentam receptores de estrogênio, cujo efeito primário é o de inibir recrutamento de osteoclastos. Durante o crescimento ósseo, os osteoclastos são necessários para a reabsorção de cartilagem calcificada e modelação óssea. No animal

adulto, essas células são responsáveis pela remodelação e, se necessário, elas mantêm as exigências de cálcio necessário para a homeostase (Fernandes, 2005).

A poedeira possui três tipos de tecidos ósseos: cortical, trabecular e medular, todos, com papéis importantes na estrutura e resistência óssea das aves e no metabolismo do cálcio (Whitehead e Fleming, 2000). O osso cortical e o trabecular promovem maior força estrutural do osso, enquanto o medular atua como fonte lábil de cálcio para a formação da casca (Fleming *et al.* 1998).

Como consequência da demanda funcional única do osso medular, células nestes ossos estão sob controles diferentes, quando comparamos às mesmas células, nos ossos estruturais (Knott, 1999).

1.1.1 Osso cortical

Poedeiras apresentam diferentes tipos de ossos no esqueleto, sendo o mais resistente o cortical, que é uma formação óssea lamelar. Este tipo de osso é formado durante o crescimento do animal. O osso cortical é o osso estrutural, sendo um reservatório mais estável de cálcio. É o osso mais denso, com range de porosidade entre 5 a 10 %. É encontrado primeiramente em eixos de ossos longos e formam a camada externa em volta dos ossos esponjosos no fim das juntas ou nas vértebras (Whitehead e Fleming, 2000).

Evidências de depressão na formação estrutural de ossos de poedeiras foram demonstradas por Hudson *et al.* (1993), que observou que o indicador cromo fluoreto não foi incorporado ao osso cortical.

A diminuição da força de quebra da Tíbiotarso de poedeiras, entre 15 a 25 semanas de produção, pode indicar algum acúmulo de osso medular, mas, relativamente, pequena perda de osso cortical. A maior diminuição da resistência óssea, em poedeiras de 25 a 50 semanas de produção implica em perdas consideráveis do osso cortical (Whitehead e Fleming 2000). A perda do osso cortical é crítica, uma vez que a ave não tem como repor durante o ciclo de postura (Taylor e Dacke, 1984).

Um aumento anormal da mobilização de osso cortical para a produção dos ovos predispõe o sistema esquelético da ave a quebra e outras desordens. Esta perda, avaliada pela espessura desta camada, é um processo gradual. Ossos estruturais são perdidos por todo o esqueleto, embora, ele possa ser repostado pelo osso medular. Esta perda

progressiva de osso estrutural durante o período de postura é característica da osteoporose e aumenta os riscos de fraturas (Whitehead, 2004).

1.1.2 Osso trabecular

O osso trabecular consiste em um tecido composto por fibras de colágeno entrelaçadas de forma irregular. Conforme o osso vai crescendo, por proliferação dos condrócitos no topo do disco de crescimento, seguido por hipertrofia e mineralização da parte posterior, a rede trabecular é largamente reabsorvida, para formar a cavidade medular (Whitehead, 2004).

Células de reabsorção óssea, os osteoclastos são ativos na remodelação deste tecido. As ações acopladas de reabsorção osteoclástica seguidas de formação do osso osteoblástica, resultam no desenvolvimento de uma rede de osso trabecular. Este é um tecido ósseo baseado em estrutura bastante irregular de fibrilas de colágeno. Como o osso se alonga pela proliferação contínua de condrócitos na cabeça da placa de crescimento seguido de hipertrofia e mineralização na parte traseira, a rede trabecular é largamente reabsorvida para formar a cavidade medular (Beck, 2004).

O osso trabecular é mais responsivo que o osso cortical à mobilização e deficiência de estrogênio. Há relatos de que efeitos específicos de citocininas são os responsáveis por estas diferenças (Poli *et al.*1994). Estudos demonstram maior glicosilação do colágeno no osso trabecular que no osso cortical e aumento na glicosilação do colágeno em animais com osteoporose (Michalsky *et al.*1993).

A perda de ossos estruturais, especialmente, do osso trabecular dos ossos das pernas, pode ser bastante marcada durante os primeiros períodos de postura, embora, não esteja bem explicado como está ligado diretamente ao acúmulo inicial de osso medular (Whitehead e Fleming, 2000).

1.1.3 Osso medular

Este tipo ósseo é formado nas poedeiras quando atingem a maturidade sexual, através da influência de estrógeno e andrógeno. Este osso é mantido à custa do osso cortical, em períodos em que há baixa disponibilidade de cálcio (Etches, 1987). Possui grande número de osteoclastos em sua superfície, sendo que a atividade osteoclástica

neste osso pode oferecer cerca de 40 % do cálcio da casca, podendo ser metabolizado com taxa de 10 a 15 vezes mais rápido que o osso cortical. Sua destruição e reconstrução são extremamente rápidas e em casos de deficiência de cálcio, sua restauração é à custa do osso cortical. Seu volume total não muda durante o ciclo, apenas seu grau de calcificação (Dacke *et al.*1993).

Esta estrutura, única em aves e crocodilos, é uma fonte lábil de cálcio para a formação da casca do ovo e é estabelecido nas superfícies de ossos estruturais e em espículas entre as cavidades medulares, em especial em ossos longos (Withehead, 2004). Consiste em sistema de espículas que crescem fora da superfície interna dos ossos. É menos denso que o osso cortical, com menor número de fibras de colágeno, além de ser composto também por proteínas não colagenosas, proteoglicanas e carboidratos (Dacke *et al.*1993).

O osso medular é mais fraco que o osso estrutural por duas razões. Primeiro, porque é uma forma de tecido ósseo baseada em organização muito irregular de fibras de colágeno e, em segundo lugar, porque muito deste tecido é isolado em espículas. Isto não significa que ele não tenha papel estrutural, sua cobertura da superfície estrutural ajuda manter a conectividade trabecular e sua presença na cavidade medular aumenta a resistência à fraturas (Fleming *et al.* 1998).

A densidade mineral deste tipo ósseo é usualmente similar ao do osso esponjoso, assim sendo, as mensurações radiográficas de densidade ou cinzas nestes ossos dão pouca informação relevante no que diz respeito à osteoporose, Withehead e Fleming (2000).

A quantidade de osso medular cresce rapidamente durante os estágios iniciais do período de postura e pode continuar a ser acumulado, de forma lenta durante todo o período (Withehead, 2004). Esta estrutura óssea sofre *turnover* rapidamente durante períodos de insuficiência dietética de cálcio, para a formação da casca dos ovos e é repleto, quando o nível de cálcio se mantém acima das exigências do animal (Fleming *et al.* 1998).

As células deste tecido atuam de forma diferente, quando comparadas às células dos demais tecidos ósseos. Os osteoclastos derivados do osso medular parecem ser refratários ao cálcio, durante o período da calcificação da casca do ovo e há estudos controversos sobre a presença de receptores de estrogênio nos osteoclastos deste tecido, ao contrário do que ocorre com outras células osteoclásticas (Oursler *et al.*1991).

Durante o ciclo da formação da casca dos ovos, há intenso processo de diminuição do osso medular, através da atividade dos osteoclastos, podendo inclusive, ocorrer redução total deste (Dacke *et al.* 1993).

A bioquímica do colágeno deste tecido é muito incomum, quando comparada à bioquímica do osso estrutural. O conteúdo de colágeno do osso medular é menor que um quarto do total do osso cortical, enquanto o componente proteico não colagenoso é maior que no osso cortical, sendo cerca de 40 % do volume total do osso seco. O conteúdo de mineral também é menor que do osso cortical (Knott, 1999).

1.2 Dinâmica óssea em poedeiras

O processo da formação do ovo envolve várias etapas, na primeira delas ocorre o crescimento do folículo no ovário. Logo que um folículo amadurece, o estrogênio, produzido por ele atua em sinergismo com andrógenos, induzindo a formação de um sistema ósseo secundário nas cavidades medulares de muitos ossos, em especial, os longos, a este sistema, denominamos ossos medulares (Whitehead e Fleming, 2000).

Durante a etapa de calcificação da casca do ovo nas poedeiras, em torno de 2,4 g de cálcio são necessários em aproximadamente 20 horas para produzir a casca de um ovo de peso médio de 60 g. Apenas 60 a 70 % do cálcio da casca podem ser providos via alimentação, o restante, deve ser mobilizado das reservas corporais (Driggers e Comar, 1949). A calcificação de cada casca é acompanhada pela reabsorção óssea, associada a intensa atividade osteoclástica e logo após a postura do primeiro ovo, as fases de reabsorção óssea dão lugar a formação óssea (Mueller *et al.* 1964).

A quantidade de osso medular aumenta rapidamente durante a recria e o período inicial de postura e pode continuar a se acumular lentamente ao longo do restante da vida produtiva da ave. Estudos realizados por Hudson *et al.* (1993), utilizando marcadores fluorescentes, não indicaram formação óssea ou remodelação óssea medular durante o período de postura.

A perda de ossos estruturais, como o osso trabecular, especialmente na diáfise e epífises dos ossos da perna, pode ser bastante acentuada durante o período inicial de postura, embora não se saiba se isso está diretamente ligado ao acúmulo inicial de medula óssea (Whitehead e Fleming, 2000).

O aumento da absorção de cálcio no intestino, durante o período de formação da casca não é suficiente para satisfazer o alto requerimento do cálcio. A duração da taxa de passagem da ingesta através do esôfago (3h), moela (1h) e intestino (3 a 4 h) e o fato da maioria do Ca ser absorvido no intestino, durante os primeiros 75 a 78 minutos após deixar a moela, é evidente que 6 a 10 horas após a interrupção da dieta, o intestino da poedeira estará sem cálcio.

Como a ingestão de alimentos cessa na primeira hora de escuro e a calcificação da casca ocorre, principalmente durante o período sem luz, uma porção considerável de cálcio deve ser mobilizada das reservas ósseas. Uma estimativa desta proporção é de 20 a 40 % de todo o cálcio da casca (Bar, 2009).

Durante períodos com luz natural ou artificial, a poedeira, através da ingestão de cálcio da dieta, mantém seu organismo em homeostase. No período da noite, em que não há oferecimento de cálcio, caso a poedeira esteja formando a casca do ovo, há mobilização óssea suficiente para evitar má calcificação da casca. Após a postura do ovo, os osteoblastos são ativados e regeneram o osso medular. Embora o osso medular seja importante para a formação da casca, não há nenhuma relação direta entre ele e a quantidade de casca (Whitehead, 2004).

A perda de osso cortical, tal como avaliado pela espessura do osso cortical, é um processo mais gradual. O osso estrutural é perdido ao longo do esqueleto, a partir dos ossos longos das asas, pernas, vértebras, quilha, e outros ossos, embora possa ser substituído por osso medular. Esta perda progressiva de osso estrutural durante o período de postura é característica de osteoporose e resulta no enfraquecimento do esqueleto (Whitehead, 2004).

Embora o conteúdo de osso estrutural diminua durante o período, o acúmulo de osso medular significa que o conteúdo total do osso pode permanecer constante ou mesmo aumentar durante o período de postura.

O osso medular é, fundamentalmente, mais fraco do que o osso estrutural por ser uma forma de tecido ósseo baseado em um arranjo muito irregular de fibrilas de colágeno. Isso não significa que o osso medular não tenha benefício estrutural global, a sua estrutura de cobertura de superfície óssea pode ajudar a manter o osso trabecular e a sua presença no interior da cavidade do osso pode aumentar resistência à fratura como mostra a forte relação positiva entre força do úmero e seu conteúdo de osso medular (Fleming *et al.* 1998).

O efeito líquido da substituição do osso estrutural, com o medular é o enfraquecimento da força global do esqueleto de galinha e, assim, um aumento do risco de fratura. Osso medular é radiodenso como osso estrutural e, portanto, medições de densidade radiográfica ou teor de cinzas do osso não são boas medidas de qualidade óssea quando a estrutura óssea medular está presente (Dacke, 1993).

O osso medular desaparece gradualmente durante o período produtivo e a formação de osso estrutural recomeça à medida que o animal diminui sua demanda de cálcio para formação da casca. Este ciclo de perda de massa óssea estrutural durante a postura, seguida por regeneração é fundamental para que a poedeira possa manter a boa qualidade do osso ao longo de sua vida (Sugiyama, 1993).

Em poedeiras, o aumento significativo do estrogênio circulante no início da maturidade sexual, tem efeito estimulador sobre osteoblastos, levando-os a produzir osso medular em vez de osso estrutural. Esta formação é revertida quando as aves saem do período de postura e os níveis de estrogênio declinam (Whitehead e Fleming, 2000).

Existe um aumento da reabsorção osteoclástica durante o período de formação da casca. No entanto, os osteoclastos não são específicos para osso medular e a reabsorção também pode ocorrer em superfícies de ossos estruturais, explicando a perda óssea osteoporótica estrutural (Sugiyama, 1993). Um aspecto importante a ser considerado dentro do assunto qualidade óssea em poedeiras, é a perda de ossos estrutural, que ocorre de forma gradativa, com o avanço da idade do animal, levando poedeiras à apresentarem osteoporose.

Segundo Withehead e Wilson (1992), a osteoporose em poedeiras surge como resultado da diminuição na formação óssea osteoblástica estrutural, quando a ave atinge a maturidade sexual. Durante o período produtivo há contínuo declínio na massa de osso estrutural na poedeira, mas, a extensão do declínio da estrutura óssea parece estar mais relacionada com a duração do período reprodutivo do que com a taxa de postura destas aves.

De acordo com Withehead e Fleming (2000), o aparecimento da osteoporose em poedeiras de alto desempenho tem sido atribuído a dois fatores: o primeiro, ao confinamento, o que acarreta osteoporose por desuso e em segundo, a seleção genética moderna que têm produzido animais cada vez mais leves com baixa capacidade de consumo de alimentos, porém com alta produção de ovos grandes.

A osteoporose em poedeiras é caracterizada por perda de massa de osso estrutural normalmente mineralizado e é tipificada por uma fina camada de osso cortical, bem como, uma fina camada e perda de conectividade do osso trabecular (Whitehead e Wilson, 1992). Na osteoporose, o osso é normalmente mineralizado, mas, sua massa total é reduzida, geralmente, com largos espaços através dos ossos (Knowles, 1997).

O declínio dos ossos estruturais e trabecular não causa mudanças nas dimensões externas dos ossos longos uma vez que a reabsorção do osso cortical é confinada à superfície endosteal. Entretanto, o afinamento do osso cortical e a perda da integridade do osso trabecular resultam em ossos quebradiços e mais susceptíveis a fraturas (Gregory e Wilkins, 1989).

O problema de bem-estar da osteoporose em poedeiras é geralmente ligado com a incidência de fraturas. Os ossos das aves são inervados e quando comparados aos ossos humanos que são igualmente inervados, conclui-se que as fraturas ósseas em aves são igualmente doloridas (Whitehead e Flaming, 2000).

1.3 Ácido L-glutâmico e Metabolismo Ósseo

Nos últimos anos, estudos do metabolismo ósseo têm sido realizados, principalmente relacionados a problemas metabólicos humanos como a osteoporose. Dentre estes, muitos reportam um papel fisiológico do ácido L-glutâmico (glutamato) no controle de atividades de células ósseas como, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Estudos têm demonstrado a possibilidade do Ácido L-glutâmico ser, além de precursor de proteínas “Gla, que contêm resíduos do aminoácido γ -carboxiglutâmico denominadas Gla-proteínas (Moraes *et al.* 2010), como a osteocalcina, um dos fatores endógenos parácrinos, usados para comunicação intracelular nas células ósseas (Mason *et al.* 1997). Subtipos de receptores (GluRs) e transportadores (GluTs) de glutamato foram descritos em osteoblastos e osteoclastos de humanos e roedores (Hinoi *et al.* 2004).

Receptores funcionais de glutamato têm sido identificados em órgãos como medula adrenal, fígado, ilhotas pancreáticas, células β , megacariócitos, queratinócitos, coração e ossos (Yoneda *et al.* 1986 e Skerry *et al.* 2001).

Os receptores para Glu são divididos em duas grandes categorias, os ionotrópicos e os metabotrópicos, baseados nos mecanismos de transdução de sinal intracelular e na sua homologia molecular, além de cinco subtipos de transportadores. Estes receptores e transportadores estão associados ao sistema nervoso central (Hinoi *et al.* 2003).

Em ossos de mamíferos foram descritos receptores do tipo GluR3 em cultura de osteoblastos (Hinoi *et al.* 2002a). Hinoi *et al.* (2002b) demonstraram também a expressão de VGLUT (Vesicular Glu Transporters) ou transportadores vesiculares de glutamato em cultura de osteoblastos, independente de seu grau de maturidade. Além disso, os ossos supostamente possuem inervação de fibras simpáticas e glutaminérgicas (Takeda *et al.* 2002 e Serre *et al.* 1999).

A primeira descrição a respeito da sinalização glutaminérgica no osso foi realizada por Mason *et al.* (1997), que demonstraram a expressão do RNAm dos transportadores de glutamato em osteoblastos cuboides e osteócitos ativos, que eram regulados nos ossos de ratos *in vivo*. Dois transportadores de glutamato foram identificados nos ossos, GLAST – 1, localizado em osteoblastos cuboides ativos, e GLT-1 expresso nas células da medula óssea.

Bhangu *et al.* (2000) e Taylor, (2002) demonstraram que as células ósseas possuem toda a maquinaria necessária para a sinalização do glutamato e numerosos componentes pré e pós-sinápticos da sinalização neuronal do glutamato têm sido identificados nestas células.

A proteína tirosina quinase Src aumenta a fosforilação dos componentes da sinalização neural glutaminérgica. Por esta proteína ser altamente expressa em osteoblastos, considera-se que o controle da proteína Src nos osteoclastos pode promover novo caminho para a prevenção da osteoporose (Khor e Seeburg, 1996).

O ácido L-glutâmico tem sido estudado em frangos de corte com o objetivo de melhorar a estrutura óssea, pelo rápido crescimento e ganho de peso que as aves atualmente apresentam. Em poedeiras, no entanto, não há literatura disponível. De acordo com Morris (1993), frangos de corte submetidos a dietas purificadas com baixo teor de ácido L-glutâmico apresentam problemas de pernas em cerca de 15 dias.

No metabolismo de aves, além dos aminoácidos essenciais, o suprimento em dietas de aminoácidos purificados, de fonte de nitrogênio não específico, é necessário para a síntese de aminoácidos não essenciais e outros compostos nitrogenados (Silva *et al.* 2001).

De acordo com Moraes *et al.* (1984), Ribeiro *et al.* (1995a, b), Rodrigues e Moraes (1995) e Rodrigues *et al.* (1996), as deformações ósseas das pernas em frangos de corte podem aparecer em razão da deficiência de nitrogênio não-específico.

Alguns estudos apontam que animais com problemas de pernas apresentam altos teores de proteínas não colagenosas (PNC) ou extraíveis com EDTA, com pequenas alterações nos teores de proteínas colagenosas (PC) e de alguns constituintes da fração mineral de Tíbiotarso e fêmur (Silva *et al.* 1995). Mudanças nas concentrações de proteínas não colagenosas podem contribuir para a fragilidade do osso por interferirem na completa mineralização e/ou na arquitetura normal (Vetter *et al.* 1991; Young, 2003).

Entre as proteínas não colagenosas, destacam-se aquelas que contêm resíduos do aminoácido γ -carboxiglutâmico (Gla), denominadas Gla-proteínas (osteocalcina e Gla-proteína da matriz) (Moraes *et al.* 2010).

A osteocalcina é uma proteína de baixo peso molecular, encontrada na fração PNC. Esta proteína contém resíduos de aminoácido γ -carboxiglutâmico (Gla), oriundos da carboxilação dos resíduos de ácido l-glutâmico, mediante processo catalisado por um complexo multienzimático, dependente de vitamina K (Olson, 1984).

1.3.1 Marcadores de turnover ósseo

Os marcadores são considerados indispensáveis hoje em dia nas avaliações de efetividade de uma droga para o tratamento da osteoporose, além de dar grandes contribuições científicas sobre fisiologia e fisiopatologia do tecido ósseo (Saraiva e Castro, 2002).

Os mais sensíveis marcadores para formação e remodelação óssea são: osteocalcina e fosfatase alcalina. Recentemente, a fosfatase ácida tem sido investigada como marcador de remodelação óssea potencial (Leeming, 2006).

1.3.1.1 fosfatase alcalina

A formação óssea se inicia na zona inferior hipertrófica. Condroclastos reabsorvem matriz e condrócitos hipertrofiados totalmente, secretam fosfatase alcalina, que ajudam

a iniciar a formação inicial de cristais de hidroxiapatita, o mineral do osso (Whitehead, 2004).

A função da fosfatase alcalina é desconhecida. A hipofosfatasia, condição na qual a enzima está ausente, é caracterizada por osteomalacia, sugerindo que a fosfatase alcalina tem papel na mineralização do osso recém-formado. Acredita-se que, a fosfatase alcalina aumenta a concentração local de fósforo inorgânico ou ativa as fibras de colágeno, causando deposição de sais de cálcio. Em virtude da difusão no sangue, em geral, a fosfatase alcalina é um bom indicador da velocidade de formação óssea (Parthemore *et al.* 1993).

Esta enzima tem sido associada à mineralização da matriz (Robinson, 1923) e a diminuição da atividade desta enzima é relacionada com o prejuízo no processo de mineralização.

As alterações nos níveis de fosfatase alcalina suportam a ideia de que o osso medular promove Ca durante a formação da casca dos ovos e armazena Ca quando não há ovo no útero (Etches, 1987). De acordo com Taylor (1965), o nível de fosfatase alcalina que está relacionado à atividade osteoblástica é maior quando o processo de formação da casca do ovo não está acontecendo.

1.3.1.2 fosfatase ácida

A fosfatase ácida é uma enzima lisossômica encontrada no osso, na próstata de mamíferos, plaquetas, eritrócitos e baço. Seis diferentes isoenzimas foram descritas para a fosfatase ácida. A fosfatase ácida exerce papel fundamental durante o processo de metabolismo ósseo. Esta tem sido localizada em osteoclastos usando microscopia de luz e eletrônica (Doty, 1991).

A isoenzima da fosfatase ácida relacionada com o osso é a isoforma resistente ao tartarato (TRAP), mas instável. TRAP pode ser medida no soro ou plasma por eletroforese (depois do tratamento com tartarato) ou por imunensaio (Watts, 1999). Esta fosfatase tem sido encontrada bioquimicamente e histologicamente em ossos, sugerindo que a TRAP pode ser usada como marcador específico para atividade osteoclástica (Dacke *et al.* 1993).

As concentrações de fosfatase ácida são normalmente superiores no plasma por causa da liberação da mesma a partir de eritrócitos durante a coagulação (Doty, 1991). De acordo com Etches (1986), o aumento nos níveis séricos da enzima fosfatase ácida,

indica que o osso medular oferece cálcio durante a formação da casca, uma vez que seu nível reflete a atividade osteoclástica, ou seja, um indicativo de que a matriz óssea está sendo destruída para liberação de cálcio, com a finalidade de formar a casca do ovo.

A regra geral da fosfatase ácida na reabsorção óssea tem sido estudada desde que houve a descoberta de aumento de atividade da enzima, em períodos de remodelação óssea (Lau *et al.* 1987, citados por Dacke *et al.* 1993). Taylor *et al.* (1965), demonstraram alterações cíclicas na atividade das fosfatases ácidas e alcalinas durante a formação da casca dos ovos em pombos. Estudos *in vitro* têm provido evidências do potencial dos hormônios calciotrópicos na liberação de TRAP. Minkin (1982) relatou que a estimulação da reabsorção óssea, com PTH ou 1,25 diidroxivitamina D₃, aumentou a atividade da TRAP.

Não há evidências da atividade de fosfatase ácida extracelular associada a estas células, entretanto, 20 minutos após a administração de PTH, a enzima estava presente na matriz e nos espaços extracelulares adjacentes a borda escovada dos osteoclastos associados à reabsorção óssea (Dacke *et al.* 1993).

Os níveis séricos de cálcio parecem ser um dos fatores que também regulam a secreção de TRAP. Entretanto, ao contrário do que ocorre na maioria das células, em que o aumento do Ca leva ao aumento da exocitose, nos osteoclastos, um elevado valor de Ca, eleva o nível de Ca inorgânico e inibe a secreção de TRAP de ratos recém-nascidos (Datta *et al.* 1989; Moonga *et al.* 1990).

1.3.1.3 cálcio e fósforo plasmáticos

O processo de reabsorção óssea resulta na dissolução da matriz da hidroxiapatita, gerando íons de cálcio, bem como, fósforo iônico. Durante a calcificação da casca, níveis plasmáticos de cálcio total e ionizado diminuem, indicando que há um dreno nas reservas de cálcio que não é totalmente compensado, pela dieta e pela mobilização óssea (Parsons, 1980).

O cálcio é encontrado no soro de aves, bem como, de outros animais, em três formas: ligado a proteínas plasmáticas, ligado a compostos inorgânicos e livremente dissociado ou ionizado (Coop, 1969). O componente fisiologicamente ativo é o cálcio ionizado. A maioria das pesquisas relacionam a homeostase de cálcio, avaliando o teor de cálcio total no sangue (CaT), entretanto, esta determinação não permite estimativa

real do (Ca^{++}), uma vez que, fatores como pH sanguíneo, força iônica e concentração de proteínas possuem efeitos no equilíbrio do cálcio ligante à proteínas plasmáticas (Moore, 1970).

De acordo com Luck *et al.* (1980), o nível plasmático de cálcio iônico no sangue de aves em dois pontos específicos no período produtivo: quando um ovo está ativamente sendo calcificado no útero e quando o útero está vazio. Estes autores encontraram diferenças significativas nos níveis de cálcio iônico, aparentemente, dependente da situação em que se encontra o útero, sugerindo então, um ciclo flutuante.

O nível de fósforo plasmático durante o ciclo de postura parece ter um padrão definido de duas fases diferentes. Estudos demonstraram que o nível plasmático de fósforo aumenta durante a formação da casca (Feinberg *et al.* 1937). Quando a casca do ovo tem sua calcificação finalizada, a deposição óssea começa, levando a queda no valor plasmático de fósforo sérico, mantendo-se estável por cerca de 5 horas (Miller, 1977).

Durante o período em que não há formação da casca, uma parte do fósforo é dirigida para a deposição na gema do ovo e outra se combina ao cálcio para ser depositado no osso. No período de calcificação da casca do ovo o cálcio para tal função é proveniente da dieta e do esqueleto ósseo (Maggioni *et al.* 1996).

1.4 Ácido L-glutâmico e intestino

O Ácido L-glutâmico (Glu) é um aminoácido não essencial, convertido no organismo em Glutamina (Gln) através da ação da enzima l-glutamina sintetase (Dewald e Moore 1958). Desempenha papel fundamental na promoção da saúde intestinal, uma vez que é o precursor obrigatório para síntese de Gln (Neame *et al.* 1957) e síntese de glutathione na mucosa intestinal (Canas *et al.* 1969) que desempenha papel importante na manutenção da mucosa contra agentes tóxicos e produtores de peróxidos.

Os mecanismos de absorção catabolismo de aminoácidos na mucosa do intestino delgado, principalmente da Glutamina, do Glutamato e do Aspartato (Asp), foram extensivamente estudados em ratos adultos por Windmueller (1982).

O tecido intestinal de ratos adultos utiliza cerca de 30 % da Gln disponível no sangue arterial e muito pouco do Glu e do Asp. No entanto, cerca de 98 % do Glu

intraluminal é extensivamente metabolizado pela mucosa do intestino delgado (Wu, 1998).

A Gln é o aminoácido mais abundante no plasma de animais (Hamilton, 1945; Smith e Panico, 1985). Ela é considerada o combustível metabólico primário das células epiteliais do intestino, que possuem alta taxa de divisão. Tem papel importante na promoção da renovação celular intestinal, auxiliando na manutenção da barreira de proteção do intestino (Windmueller e Spaeth, 1980; Windmueller, 1982).

De acordo com Wu (2009); Tapiero *et al.* (2002) e Newsholm *et al.* (2003) a glutamina e glutamato podem ser convertidos um no outro em diferentes órgãos, tais como intestino, fígado e rim e ambos estão relacionadas com o desenvolvimento de trato gastrointestinal de frangos e poedeiras. Atenção especial tem sido dada a aglutamina, que é distribuída para a mucosa do intestino delgado, através do sistema sanguíneo. No entanto, Reeds *et al.* (2000) propuseram que o glutamato é o substrato mais importante para o desenvolvimento do trato gastrointestinal.

Segundo Windmueller (1982), Windmueller (1974) e Neame e Wiseman (1958), os tecidos intestinais são responsáveis por um metabolismo significativo de glutamato e de glutamina da dieta. Desde então, grandes estudos com isótopos estáveis têm auxiliado na compreensão do metabolismo intestinal do glutamato e da glutamina, confirmando que pouco ou nenhum glutamato da dieta entra tanto via sistêmica (Matthews *et al.* 1993), quanto via corrente sanguínea, ou seja, ele é oxidado na região esplênica (Battezzati *et al.* 1995) e provavelmente, na mucosa intestinal, e serve como um substrato de alta significância energética (Reeds *et al.* 1996).

Diferentes métodos têm sido utilizados para o estudo da cinética de proliferação celular. Entre eles se encontra a imunohistoquímica, técnica na qual são utilizados anticorpos monoclonais contra antígenos específicos de células proliferativas, permitindo avaliações da taxa de proliferação celular. Entre os anticorpos monoclonais mais utilizados está o PCNA, antígeno nuclear da proliferação celular (Rabenhorst *et al.* 1993).

O epitélio intestinal sofre renovação celular rápida e esta renovação depende de células-tronco intestinais, situados na cripta das vilosidades intestinais para gerar novas células que, conseqüentemente, migram ao longo do eixo das vilosidades (Yang, 2009).

De acordo com Uni *et al.* (1998), a técnica de coloração feita pelo PCNA indica a presença de células com núcleos em processo de proliferação, tanto na região das

criptas, como ao longo das vilosidades da mucosa gastrintestinal de frangos de corte, além de alguma atividade na porção superior dos vilos.

Apesar do sistema de criação das poedeiras em gaiolas reduzir o contato das mesmas com agentes patógenos a que os frangos de corte estão sujeitos por serem criados em cama, a melhoria na saúde intestinal apresenta reflexos como, melhoria no aproveitamento da ração, melhoria na resistência a doenças, em especial em animais que estiverem passando por períodos críticos de temperatura e grandes desafios sanitários.

A suplementação com Glu visa promover esta melhoria no intestino das poedeiras, uma vez que este aminoácido possui muita importância no desenvolvimento e manutenção da saúde intestinal.

1.5 Referências Bibliográficas

Beck MM, Hansen KK. Role of estrogen in avian osteoporosis. *Poultry Science* 2003; 83:200-206.

Bhangu PS, Genever PG, Spencer GJ, Grewal TS, Skerry TM. Mechanisms for regulated uptake and release of glutamate by osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 2000. Res. (Suppl. 1), SU 190.

Battezzati A, Brillon DJ & Matthews, DE. Oxidation of glutamic acid by the splanchnic bed in humans. *Am. J. Physiol.* 1995; 269:269 – 276.

Bar A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2009; 152:477-490.

Bishop SC, Fleming RH, McComack HA, Flock DK, Whitehead CC. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. *British Poultry Science* 2000; 41(1):33-40.

Canas F, Tarepka A, Neuman W. Potassium and milieu interieur of bone. *Am J. Physiol.* 1969; 217:117-120.

Cook ME. Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poultry Science* 2000; 79(7):982-984.

Dacke, CG, Arkle S, Cook DJ, Wormstone IM, Jones S, Zaidi M, Bascal ZA. Medullary bone and avian calcium regulation. *J. exp. Biol.* 1993; 184:63–88.

Datta HK, Macintyre I, Zaidi M. The effect of extracellular calcium elevation on morphology and function of isolated rat osteoclasts. *Biosci. Rep.* 1989; 9:747–751.

Doty SB. Histochemistry and enzymology of osteoclasts. In *Bone, vol.2, The Osteoclast* (ed. B. K. Hall), pp. 61–85. Ann Arbor: CRC Press, 1991.

Driggers JC, Comar CL. The secretion of radioactive calcium in the hens egg. *Poultry Sci.* 1949; 28:420-424.

Etches RJ. Calcium logistics in the laying hen. *J. Nutr.* 1987; 117:619-628.

Fernandes IC. Fisiologia e Patogênese Óssea. Disponível Em: hurnp.uel.br/farmaco/materias/greghi. Acesso em: 01/08/2012.

Fleming RH, McCormack HA, Mctair L, Whitehead CC. Digitised fluoroscopy (DF) predicts breaking strength in osteoporotic avian bone in vivo. *British Poultry Science* 1998; 39:49-51.

Feinberg JG, Hughes JS, Scott HM. Fluctuations in calcium and inorganic phosphorus in the blood of the laying hen during the cycle of one egg. *Poultry Sci.* 1937; 26:132-134.

Gregory NG, Wilkin LJ. Effect of slaughter on bleeding efficiency in chickens, *Journal of Science of Food and Agriculture* 1989; 47:13-20.

Hamilton PB. Glutamine: a major constituent of free α -amino acids in animal tissues and blood plasma. *J. Biol. Chem.* 1945; 158:397-409.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423:349-355.

Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Ysuchihashi Y, Yoneda Y. Glutamate signaling in peripheral tissue. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271: 1-13.

Hinoi E, Fujimori S, Takemori A, Kurabayashi H, Nakamura Y, Yoneda Y. Demonstration of expression of mRNA for particular AMPA and kainate receptor subunits in immature and mature cultured rat calvarial osteoblasts. *Brain Res.* 2002; 943:112–116.

Hinoi E, Fujimori S, Takarada T, Taniura H, Yoneda Y. Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297:452–458.

Hudson HA, Britton WM, Rowland GN, Buhr RJ. Histomorphometric Bone Properties of Sexually Immature and Mature White Leghorn Hens with Evaluation of Fluorochrome Injection on Egg Production Traits *Poultry Science* 1993; 72:1537-1547.

Knott L, Bailey AJ. Collagen biochemistry of avian bone: Comparison of bone type and skeletal site. *British Poultry Science* 1999; 40 (3):371-379.

Knowles TG, Wilkins, LJ. The problem of broken bones during the handling of laying hens – A review. *Poultry Sci.* 1998; 77:1798-1802.

Khor G, Seeburg PH. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor channels by protein tyrosine kinases of the Src family. *J. Physiol.* 1996; 492:445-452.

Leeming DJ, Alexandersen P, Karsdal MA, Qvist P, Schaller S, Tanko LB. An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006; 62:781–92.

Luck MR, Sommerville BA, Scanes CG. The effect of eggshell calcification on the response of plasma calcium activity to parathyroid hormone and calcitonin in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1980; 65(A):151–154.

Maggioni R, Rutz F, Roll VFB. Efeito do horário de fracionamento de dietas contendo diferentes níveis de cálcio sobre o desempenho produtivo e qualidade de casca em poedeiras semipesadas no verão. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. Fortaleza -CE. p.47-49.

Matthews DE, Marano MA, Campbell RG. Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamate in humans. *Am. J. Physiol.* 1993; 264:848–854.

Mason DJ, Suva LJ, Genever PG, Patton AJ, Steuckle S, Hillam RA. Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents? *Bone* 1997; 20:199–205.

Minking C. Bone Acid Phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified Tissue Int.* 1982; 34:285-290.

Michalsky M, Norrissuarez K, Bettica P, Pecile A, Moro L. Rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation are differently influenced by ovariectomy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993; 192:1281-1288.

Miller SC. Osteoclast cell-surface changes during the egg-laying cycle in Japanese quail. *J. Cell Biol.* 1977; 75:104–118.

Moonga BS, Moss DW, Patchell A, Zaidi M. Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. *J. Physiol.* 1990; 429:29–45.

Moore EW. Ionized calcium in normal serum ultrafiltrates and whole blood determined by ion-exchange electrodes. *J. Clin. Res.* 1970; 49:318-334.

Moraes GHK, Rogler JC, Featherston WR. Effects of a nonspecific nitrogen deficiency on growth rate and leg problems in chicks. *Poultry Science* 1984; 52(2):344-353.

Moraes GHK, Rodrigues ACP, Silva FA, Rostagno HS, Minafra CS, Bigonha SM. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina K na composição bioquímica parcial de fêmures de frangos de corte. *R. Bras. Zootec.* 2010; 39(4):796-800.

Morris MP. National survey of leg problems. *Broiler Industry* 1993; 93(5):20-24.

Muller WJ, Schraer H. Calcium metabolism and skeletal dynamics of laying pullets. *J. Nutr.* 1964; 84:20-36.

Neame KD, Wiseman G. The transamination of glutamic and aspartic acids during absorption by the small intestine of the dog in vivo. *J. Physiol.* 1957; 135:442-450.

Neame KD, Wiseman G. The alanine and oxo acid concentrations in mesenteric blood during the absorption of L-glutamate acid by the small intestine of dog, cat and rabbit in vivo. *J. Physiol.* 1958; 140:148–155.

Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function* 2003; 21:1-9.

Olson RE. The function and metabolism of vitamin K. *Annual Review of Nutrition* 1984; 4:281-337.

Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen JP, Riggs BL, Spersberg, TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc. natn. Acad. Sci.* 1991; 88:6613–6617.

Parthemore JG, Burton DW, Deftos LJ. Associations and dissociations between serum bone Gla protein and alkaline phosphatase in skeletal metabolism. *Journal of Orthopaedic Research* 1993; 11:671-676.

Parsons AH, Combs JR. Blood Ionized Calcium Cycles in the Chicken. *Poult Sci.* 1980 ; 60 :1520-1524.

Poli V, Balena R, Fattori E, Marratos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, Constantini E. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO Journal* 1994; 13:1189-1196.

Rabenhorst S, Burini R, Schmitt F. Ciclo celular: Marcadores de proliferação celular. *Revta Bras. Pathol.Clin.* 1993; 29(1):24-28.

Rath NC. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Science* 2000; 79:1024-1032.

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal Glutamate Metabolism. *Journal of Nutrition* 2000; 130:978S-982S.

Reeds PJ, Burrin DG, Jahoor F, Wykes L, Henry J, Frazer EM. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. *Am. J. Physiol.* 1996; 270:413–418.

Ribeiro M, Moraes GHK, Fonseca JB. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não específico em dietas purificadas no desenvolvimento de pintos de corte. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 1995a; 24(1):88-98.

Ribeiro M, Moraes GHK, Fonseca JB. Efeitos de ácido L-glutâmico, L-alanina e L-prolina da dieta em pintos de corte: I - Desempenho, incidência de problemas de pernas e composição química de fêmures. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 1995b; 24(5):768-777.

Riczu CM, Saunders-Blades JL, Yngvesson AK. End-of-cycle bone quality in white- and brown-egg laying hens. *Poultry Science* 2004; 83(3)375-383.

Robison R. The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 1923; 17:286–293.

Rodrigues ACP, Moraes GHK. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina K da dieta no desempenho e nas anormalidades nas pernas de pintos de corte. *Revista Ceres* 1995; 42(248):270-278.

Rodrigues ACP, Moraes GHK, Rostagno HS. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina K no comprimento e na composição química parcial de Tíbiotarsos e fêmures de pintos de corte. *Revista Ceres* 1996; 43(249):567-580.

Saraiva GL, Castro, ML. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002. 46(1):72-78.

Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone* 1999; 25:623-629.

Silva FA, Moraes GHK, Rodrigues ACP, Oliveira MGA, Rostagno HS, Albino LFT, Fonseca CC, Minafra CS. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D3 no desempenho e nas anomalias ósseas de pintos de corte. *Rev.bras.zootec.*, 2001; 30(6S):2059-2066.

Silva FA, Moraes GHK. Effects of L-glutamic on growth and partial chemical composition of tibia and femur of chicks. In: reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular, 1995, Caxambu, MG, 1995. *Anais ... São Paulo: SBBQ*, 1995. p.51

Skerry TM, Genever PG. Glutamate signaling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; 22:174-181.

Smith R, Panico K. Automated analysis of ophthalaldehyde derivatives of amino acids in physiological fluids by reverse high performance liquid chromatography. *J. Lip. Chromatogram*. 1985; 8:1783-1788.

Sugiyama T, Kusraha S. Ultrastructural changes of osteoclasts on hen medullary bone during the egg-laying cycle. *British Poultry Science* 1993; 34:471-477.

Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002; 111:305-317.

Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. Free amino acids in human health and pathologies - II. Glutamine and glutamate. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002; 56:446-457.

Taylor TG, Dacke CG. Calcium metabolism and its regulation. In *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, vol. 5; ed. F. M. Freeman. London: Academic Press, 1984. p. 125-170.

Taylor TG, Williams A, Kirkley J. Cyclic changes in the activities of plasma acid and alkaline phosphatases during eggshell calcification in the domestic fowl. *Can. J. Physiol* 1965; 43:451-457.

Taylor AF. Functional osteoblastic ionotropic glutamate receptors are a prerequisite for bone formation. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 2002; 2:415-422.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. [2013]. Estatísticas Ubabef. Disponível em: <<http://www.uba.org.br.html>> Acesso em: 16 Agosto de 2013.

Uni Z, Ganot S, Sklan D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science* 1998; 77(1):75-82.

Vetter V, Fisher LW, Mintz KP. Osteogenesis imperfecta: changes in noncollagenous protein in bone. *Journal Bone Mineralization Research* 1991; 6(5):501-505.

Whatts. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999; 45:1359-1368.

Whitehead CC, Wilson S. *Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry*. Carfax Publishing Co. 1992; 265-280.

Whitehead CC. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poultry Science* 2004; 83:193-199.

Whitehead CC, Fleming RH. Osteoporosis in cage layers *Poultry Science* 2000; 79: 1033-1041.

Windmuller HG, Spearth AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:107-112.

Windmuller HG. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1982; 53:202.

Windmuller HG, Spearth A. E Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:5070 –5079.

Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009; 37:1–17.

Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *Journal of Nutrition* 1998; 128:1249-1252.

Yang J, Chin YC, Jiang B, Yu X, Zhu G-Z, Chen Y, Barnard J, Mei W. hnRNP I inhibits notch signaling and regulates intestinal epithelial homeostasis in the zebrafish. *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000363.

Yoneda YK, Ogita. Localization of 3H glutamate binding sites in rat adrenal-medulla. *Brain. Res.* 1986; 383:387-391.

Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International* 2003; 14(3):35-42.

II. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a resposta à utilização de níveis crescentes de ácido L-glutâmico (Glu) na dieta, no desempenho produtivo e fisiológico de poedeiras comerciais no final do primeiro ciclo de produção, no período de 53 a 69 semanas de idade.

2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar a resposta à suplementação de Glu no desempenho produtivo de poedeiras;
- Estudar a influência da suplementação de Glu na qualidade de casca de ovos;
- Determinar a influência da suplementação de Glu em variáveis ósseas em poedeiras com 69 semanas;
- Descrever os efeitos da suplementação de Glu sobre os níveis sanguíneos de cálcio, fósforo e fosfatases em poedeiras com 69 semanas;
- Identificar o efeito da suplementação de Glu na atividade proliferativa do jejuno de poedeiras com 69 semanas.

III – ÁCIDO L-GLUTÂMICO NA ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS COMERCIAIS COM 53 A 69 SEMANAS

Resumo – Avaliou-se a suplementação de ácido L- glutâmico (Glu) na dieta de poedeiras comerciais. Foram utilizadas 240 aves da linhagem Hi-Lyne (53 a 69 semanas), organizadas em cinco tratamentos, com seis repetições e oito aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram na ração referência (T1, Glu calculado de 2,679%) e quatro tratamentos com adição de Glu: T2 (T1 + 0,2 %); T3 (T1 + 0,4%); T4 (T1 + 0,6 %) e T5 (T1 + 0,8%). Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre as variáveis analisadas para desempenho produtivo e os níveis de íons e enzimas séricas ($P > 0,05$). O cálcio na casca aumentou significativamente de forma linear ($P < 0,05$) e o índice de Seedor e a robustez do osso ($P < 0,05$) tiveram efeito quadrático significativo em função da adição de Glu. As variáveis morfométricas para jejuno não foram influenciados pelos tratamentos ($P > 0,05$), exceção a profundidade de cripta que teve efeito quadrático ($P < 0,05$). Na análise imunohistoquímica para PCNA no jejuno, foram observados qualitativamente nos tratamentos 4 e 5 mais núcleos positivos nos vilos a partir da base, enquanto que nos tratamentos 2 e 3, foram observados núcleos positivos em aproximadamente 1/3 dos vilos a partir da base. A adição de Glu influenciou na quantidade de cálcio na casca, na estrutura do tibiotarso e na atividade proliferativa do jejuno das poedeiras com 69 semanas e pode representar uma alternativa para melhoria do sistema ósseo em poedeiras.

Palavras-chave: cálcio, glutamato, ovo, PCNA, tibiotarso.

III – L-GLUTAMIC ACID IN FEED OF COMERCIAL LAYING HENS FROM 53 TO 69 WEEKS

Abstract - Were evaluated the supplementation of L - glutamic acid (Glu) acid in the diet of laying hens. 240 birds from Hi- Lyne (53-69 weeks) stain allocated into 5 treatments with 6 replicates of 8 birds each were used. The treatments consisted of the basal diet (T1, Glu calculated at 2.679 %) and four treatments with Glu addition: T2 (T1 + 0.2 %), T3 (T1 + 0.4 %) , T4 (T1 + 0.6 %) and T5 (T1 + 0.8%). There was no significant effect ($P > 0.05$) between the variables analyzed to yield performance and levels of ions and serum enzymes ($P > 0.05$). The calcium in the shell significantly increased linearly ($P < 0.05$) and the Seedor index and robustness of bone ($P < 0.05$) had a significant linear effect due to the Glu addition. The morphometric variables for jejunum were not affected by treatments ($P > 0.05$), except crypt depth that had a quadratic effect ($P < 0.05$). Immunohistochemical analysis for PCNA in the jejunum, showed more qualitatively positive cell nuclei in the villous from the base observed in treatments 4 and 5, while in treatments 2 and 3, positive nuclei were observed in approximately one third of the villi from the base. The Glu addition influenced the amount of calcium in the shell, the structure of the tibiotarsus and the proliferative activity of the jejunum of laying hens of 69 weeks and can be an alternative for improving the bone system of layers.

Key words: calcium, egg, glutamate, PCNA, tibiotarsus.

Introdução

A produção de ovos com poedeiras em gaiolas proporciona otimização da produção, bem como maior segurança alimentar, uma vez que estes ovos não possuem contato com a cama dos aviários, local em que podem ser infectados e transmitir patologias aos humanos. Por outro lado, há preocupação crescente com a condição física das aves, que se mantêm por um longo período dentro destas gaiolas.

Linhagens cada vez mais produtivas e mais precoces vêm sendo desenvolvidas e com elas, problemas que necessitam ser solucionados, como por exemplo, a osteoporose, distúrbio ósseo em que ocorre diminuição progressiva da estrutura mineralizada dos ossos e acomete grande parte das aves em produção e em fim de ciclo (Withehead, 2004). A debilidade óssea da poedeira acarreta queda na produção, levando os animais a apresentarem quadro de fadiga de gaiola ou até mesmo, óbito. Esta debilidade promove além da queda de desempenho, sofrimento às aves e, conseqüentemente, perdas econômicas que podem ser verificadas por queda na produção e por descarte das aves.

Estudos do metabolismo ósseo, principalmente relacionados a problemas metabólicos humanos, como a osteoporose, têm sido realizados destacando um papel fisiológico do ácido L-glutâmico (Glu) no controle de atividades de células ósseas como osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Estes estudos têm demonstrado a possibilidade do Glu ser, além de precursor de proteínas do tipo Gla, que contêm resíduos do aminoácido γ -carboxiglutâmico denominadas Gla-proteínas (Moraes *et al.* 2010), como a osteocalcina, um dos fatores endógenos parácrinos e autócrinos, usados para comunicação intracelular nas células ósseas (Mason *et al.* 1997). Subtipos de receptores (GluRs) e transportadores (GluTs) de Glu têm sido descritos em osteoblastos e osteoclastos de humanos e roedores (Hinoi *et al.* 2004), bem como um papel na

modulação da formação de cristais de hidroxiapatita no tecido ósseo (Hunter e Goldberg, 1994; Fisher *et al.* 1983).

No metabolismo de aves, além dos aminoácidos essenciais, o suprimento em dietas de aminoácidos purificados como fonte de nitrogênio não específico é necessário para a síntese dos aminoácidos não essenciais e outros compostos nitrogenados (Silva *et al.* 2001). O Glu tem sido estudado em frangos de corte com o objetivo de melhorar a estrutura óssea, por causa do rápido crescimento e ganho de peso que estas aves apresentam. Este é considerado uma eficiente fonte de nitrogênio não específico para promover o desenvolvimento ósseo de pintos e para reduzir a incidência de anomalias de pernas, quando fornecido em alto nível na dieta (Moraes *et al.* 1984).

O efeito do Glu sobre a manutenção e melhoria da qualidade intestinal é bem descrita. No intestino, este aminoácido funciona como combustível oxidativo que possui importante papel como melhorador da função intestinal, em especial, pela alta taxa de turnover celular que a mucosa intestinal apresenta (Burrin e Stoll, 2009). O glutamato é um aminoácido não essencial, convertido no organismo em Glutamina (Gln) através da ação da enzima l-glutamina sintetase (Dewald e Moore, 1958). A Gln é o combustível preferido pelos enterócitos e ela é capaz de aumentar a proliferação celular intestinal, melhorando assim, sua morfologia. Em frangos de corte, foi descrito que a Gln é capaz de aumentar o comprimento dos vilos (Yi *et al.* 2001), melhorando o crescimento da ave (Bartell e Batal, 2007) e, quando associada a vitamina K promove melhor desenvolvimento da mucosa intestinal em frangos (Murakami *et al.* 2007).

Com base nos estudos enfatizando os efeitos do Glu sobre o sistema ósseo e a mucosa intestinal e na escassez de literatura em poedeiras, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação dietética de Glu sobre o desempenho produtivo, variáveis

ósseas, sanguíneas e intestinais de poedeiras comerciais no período de 53 a 69 semanas de idade.

Material e Métodos

Animais

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, localizado no Município de Iguatemi, no período de setembro de 2011 a janeiro de 2012, com período experimental de 112 dias, dividido em quatro ciclos de avaliação de 28 dias. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação sob o número 052/2011.

Foram utilizadas 240 poedeiras leves da linhagem Hi-Lyne W36, com 53 semanas de idade no início do experimento. As aves foram selecionadas através do peso médio de 1,5 kg. Estas foram alojadas em galpão convencional de postura, com cobertura de telhas de barro e telas nas laterais, provido de gaiolas de arame galvanizado, com quatro divisórias medindo 25 x 45 cm cada, com duas aves em cada divisória e totalizando oito aves por gaiola. O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum* e as aves foram uniformizadas por peso ($\pm 1,5$ kg) e produção de ovos antes de começar o experimento, sendo submetidas a 14 dias de adaptação às dietas experimentais. O programa de iluminação adotado foi de 17 horas de luz. As médias de temperaturas mínima e máxima registradas foram 18,9°C e 30,13°C, respectivamente, com umidade do ar média de 64,50% para o período experimental.

Dietas experimentais

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, seis repetições e oito aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram na ração referência (T1, com valores estimados de Glu 2,679%) e em quatro tratamentos com adição de Glu: T2 – Ração Referência + 0,2 % Glu; T3 – Ração Referência + 0,4% Glu; T4 – Ração Referência + 0,6 % Glu e T5 – Ração Referência + 0,8 % Glu. As composições percentual e calculada das rações experimentais se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição percentual e níveis nutricionais das rações experimentais.

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5
Milho	58,145	58,145	58,145	58,145	58,145
Farelo de Soja (46%)	26,23	26,23	26,23	26,23	26,23
Fosfato bicálcico	1,101	1,101	1,101	1,101	1,101
Calcário calcítico	9,679	9,679	9,679	9,679	9,679
Óleo de Soja	2,549	2,549	2,549	2,549	2,549
Cloreto de Sódio (Sal Comum)	0,285	0,285	0,285	0,285	0,285
Bicarbonato de Sódio	0,352	0,352	0,352	0,352	0,352
DL-Metionina (98%)	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274
L-Valina (96,5%)	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
L-Lisina HCl (78%)	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037
L-Treonina (98 %)	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
Premix Vitamínico-Mineral*	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Ácido L-glutâmico (98,5%)	0,000	0,200	0,400	0,600	0,800
Inerte	1,000	0,800	0,600	0,400	0,200
Antioxidante BHT	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Total	100	100	100	100	100
Nutrientes Calculados					
Proteína Bruta (%)	16,50	16,82	16,93	17,05	17,16
Cálcio (%)	4,02	4,02	4,02	4,02	4,02
Fósforo Disponível (%)	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Energia Metabolizável (kcal)	2800,00	2800,00	2800,00	2800,00	2800,00
Sódio (%)	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
BED** meq	200,32	200,32	200,32	200,32	200,32
Ácido Linoleico (%)	2,68	2,68	2,68	2,68	2,68
Lisina Digestível (%)	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Met+Cist Digestível (%)	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73
Treonina Digestível (%)	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
Triptofano Digestível (%)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Valina Digestível (%)	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
Ácido L-glutâmico (%)	2,679	2,876	3,073	3,271	3,468

*Mineral and vitamin supplement, Nucleopar Animal Nutrition Ltda. (content per kg of diet): vitamin A, 2,550 IU/g; vitamin E, 2,083.33 mg; vitamin D3, 500 IU/g; vitamin K3, 650 mg; vitamin B1, 408.33 mg; vitamin B12, 2,500 µg; vitamin B2, 1,000 mg; vitamin B6, 412.5 mg; Ac. folic, 66.67 mg; biotin, 8.33 mg; choline, 70,000 mg; Ac. pantothenic, 2,375 mg; methionine, 226,875 mg; niacin, 5,308.33 mg; iron, 12,500 mg; iodine, 258.33 mg; selenium 75 mg; cobalt, 83.33 mg; antioxidant, 1,250 mg.

**BED – Balanço eletrolítico da Dieta.

Desempenho e qualidade de ovos

Os dados de consumo de ração (g/ave/dia) e conversão alimentar (kg de ração/dúzia de ovos e kg de ração/kg de ovos) foram controlados em intervalos de 28 dias. Para o cálculo da porcentagem de postura, os ovos foram coletados diariamente, duas vezes ao dia e anotados em planilhas para cada unidade experimental. A massa de ovos foi calculada multiplicando a taxa de postura (%) pelo peso médio dos ovos (g) e dividindo o resultado por 100.

No final de cada intervalo de 28 dias, por três dias consecutivos, foram avaliados o peso médio dos ovos, a altura de albúmen, o peso específico, a porcentagem e a espessura da casca. Todos os ovos íntegros, de cada unidade experimental, foram identificados e pesados individualmente em balança de precisão digital (0,01 g), e submetidos ao teste de peso específico pelo método da imersão dos ovos em solução salina com diferentes densidades (de 1,070 a 1,090 g/cm³, com variação de 0,004 para cada solução).

Uma amostra de três ovos por unidade experimental foi utilizada para a determinação da altura de albúmen. Os ovos foram quebrados em superfície plana de vidro e medida a altura do albúmen, na região mediana, entre a borda externa e a gema do ovo, utilizando um paquímetro digital. As mensurações, em milímetros (mm), foram relacionadas do peso do ovo obtendo-se assim, a **unidade Haugh** (Haugh, 1937):

$$\mathbf{UH = 100 \log (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37}),}$$

Em que:

H = altura de albúmen (mm);

W = peso do ovo (gramas).

As cascas foram lavadas e secas à temperatura ambiente por 72 horas e, em seguida, pesadas em balança de precisão digital ($\pm 0,001\text{g}$). O percentual de casca foi obtido pela relação do peso das cascas secas com o peso dos respectivos ovos. Após a pesagem das cascas, efetuou-se a medição da espessura com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo®) em três pontos na região central de cada casca.

Três ovos íntegros por unidade experimental foram utilizados para a medição da força de resistência da casca, no 28º dia de cada ciclo. A resistência, em quilograma-força (kgf), foi obtida utilizando um texturômetro modelo TAXT2i, acoplado com a probe 29 Warner-Bratzler Shear Force, mecânico, calibrado com peso-padrão de 5 kg e velocidade do seccionador de 10 mm/minuto.

Análises do soro sanguíneo

Ao final do quarto ciclo foi realizada a colheita de sangue em 3 períodos: 16h; 03h e às 12h. Os horários foram escolhidos por serem horários médios entre os principais picos de alta e baixa dos íons no sangue. Foram colhidos 3 mL de sangue via veia ulnar em uma ave por unidade experimental, em cada intervalo. Após a retração do coágulo, as amostras de soro sanguíneo foram centrifugadas a 3000 rpm e aliqüotadas para determinação de cálcio e fósforo inorgânico, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, albumina e proteínas totais (ambas utilizadas para o cálculo do cálcio iônico). Para a análise de fosfatase ácida, utilizou-se o soro fresco, armazenado em geladeira com máximo 24 horas, para as demais análises, o soro foi congelado e posteriormente analisado.

As análises sanguíneas foram realizadas com a utilização de kits. Para a análise de Fosfatase Ácida Total, utilizou-se o kit Fosfatase Ácida do Laboratório InVitro, através de Teste Colorimétrico, método Fosfohidrolase-Monoester Ortofosfórico. Para as

análises de Fosfatase Alcalina, Cálcio Total, Fósforo UV, Proteínas Totais utilizou-se os kits K019 Fosfatase Alcalina, colorimetria para diagnóstico *in vitro*, K007 Cálcio, colorimetria para diagnóstico *in vitro*, K068 Fósforo UV, teste de UV de Ponto Final para diagnóstico *in vitro*, K031 Proteínas Totais, método biureto, respectivamente, todos do Laboratório Bioclin. O Cálcio iônico foi obtido através de fórmula matemática com a utilização dos valores calculados de Cálcio Total, Albumina e Proteínas Totais, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{mg/dL} = \frac{6 \times \text{Ca} - (0,19 \times \text{P}) + \text{A}}{(0,19 \times \text{P}) + \text{A} + 6};$$

Em que:

Ca = Cálcio sérico (mg/dL)

P = Proteínas Totais (g/dL)

A = Albumina (g/dL)

Análises ósseas e morfometria do jejuno

Ao final do quarto ciclo, uma ave de cada unidade experimental foi pesada e sacrificada, através de deslocamento cervical, das quais foram retirados os ossos das pernas e fragmentos do jejuno. As aves foram sacrificadas entre 10h e 13h e os ovos estavam no início do oviduto ou no magno. Em nenhuma ave o ovo estava em processo de deposição da casca no útero.

Para avaliação dos parâmetros ósseos, o tibiotarso esquerdo de uma ave por unidade experimental foi colhida e congelada (-20° C). Após o descongelamento, o tecido muscular aderido foi retirado, os ossos foram pesados em balança analítica ($\pm 0,0001$) g e o comprimento e o diâmetro foram medidos na porção média usando paquímetro eletrônico digital (mm) para cálculo do índice de seedor (Seedor *et al.* 1991)

pela fórmula: **Índice de Seedor = peso do osso (mg)/comprimento do osso (mm)** e para o cálculo do **Índice de Robustez = comprimento do osso/ $\sqrt[3]{\text{peso do osso}}$** (Monteagudo *et al.* 1997).

A análise de resistência óssea foi realizada em um texturômetro (modelo TAXT2i), acoplado com a probe 29 Warner-Bratzler Shear Force, mecânico, calibrado com peso-padrão de 5 kg e velocidade do seccionador de 3 mm/minuto, utilizando os ossos descongelados *in natura*. O mecanismo consistiu em uma base que apoia as regiões das epífises ósseas e com a força aplicada na região central do osso. Os valores foram expressos em quilograma força (kgf).

Após a determinação da resistência óssea, os ossos foram preparados para a determinação do teor de minerais. Os ossos foram desengordurados em éter de petróleo por 24 horas, secos em estufa de ventilação forçada, triturados e pesados em balança analítica (0,001g). Posteriormente foram secos em estufa a 105°C por doze horas, pesados após resfriamento e calcinados em mufla a 600° C, para obtenção das cinzas, segundo a metodologia de Oliveira (2006). As cinzas foram usadas nas análises de matéria mineral, percentual de cálcio e fósforo na matéria mineral.

A determinação da densitometria óssea radiográfica (densidade mineral óssea) foi realizada nos tibiotarsos direitos. Os ossos foram descongelados, dissecados os tecidos musculares e obtidas radiografias dos mesmos. As peças ósseas foram colocadas sob filme radiográfico (Kodak Intraoral E-Speed Film, size 2, tipo periapical) paralelas aopentrômetro de alumínio com 10 degraus de 1 mm cada. Os ossos foram então radiografados com aparelho de raios-x odontológico DabiAtlante®, modelo Spectro 70X eletrônico (DabiAtlante, Ribeirão Preto, Brasil), operando a 70 kVp, 8 mA, utilizando com tempo de exposição de 0,2 segundos, determinado pelo teste piloto

prévio, contendo um *stepwedge*, com o feixe de raios X incidindo perpendicularmente em relação ao filme, à distância foco-filme de 10 cm.

As películas radiográficas foram reveladas em processadora automática Revel Indústria e Comércio de 43 equipamentos Ltda., com tempo de trabalho de 150 segundos, operando com soluções da Kodak RP X-Omat. As radiografias foram digitalizadas no programa Image Tool® (versão 3.0). As imagens digitais obtidas foram analisadas para determinar a densidade das peças ósseas, através do histograma de determinados pontos das imagens no software “Adobe Photoshop CS6”. As imagens em escala de tons de cinza, em que o valor 0 (zero) representa o preto e o valor 256 representa o branco, foram avaliadas no histograma em 3 áreas centrais da diáfise do osso com tamanho fixo (10 px x 10 px) e destes foram obtidos a média para cada osso.

Como referencial radiográfico, utilizou-se a escala de alumínio (penetrômetro) de 10 degraus com 1 mm de espessura entre um degrau e outro. Os dados obtidos no osso em valores de cinza foram convertidos em valores relativos à espessura da escada de alumínio. Para a conversão foi realizada a setorização da curva densitométrica característica. Em cada radiografia foi estabelecido este setor por meio da escolha de três degraus da escala (2 ao 4), cujos respectivos valores de escala de cinza limitavam a região de estudo previamente determinada no osso. Os valores de cinza dos degraus e os valores obtidos na região central da diáfise de cada osso foram analisados no Excel ® para determinar a expressão matemática que melhor se ajustava aos pontos experimentais contidos neste intervalo. Utilizando a equação obtida para cada osso determinou-se o valor em milímetros de alumínio (mmAL), para densidade mineral óssea. Quanto maior o valor obtido, maior a intensidade de tons de brancos nas imagens da diáfise, indicando maior radiopacidade e, conseqüentemente, maior densidade óssea na área analisada.

Para a morfometria intestinal, de cada poedeira (uma por unidade experimental) o intestino foi pesado e colhido fragmento do jejuno. Fragmentos de 1,5 cm do jejuno foram isolados, abertos e fixados em formol 10%, tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Os fragmentos foram processados na rotina histológica e emblocados em parafina. Cortes de 7 micrômetros foram obtidos em micrótomo e corados em Hematoxilina e Eosina. Os mesmos foram analisados em microscópio de luz e obtidas imagens digitais que foram analisadas no software Motic Images Plus 2.0[®]. Obtiveram-se valores para a altura dos vilos intestinais (30 vilos) e a profundidade das criptas (30 criptas). De cada ave foram obtidas 20 mensurações, em pelo menos seis cortes diferentes.

Imunohistoquímica para PCNA

Blocos de parafina foram cortados (5 µm) usando um micrótomo automático e os cortes acondicionados em lâminas silanizadas. A atividade proliferativa das células intestinais das criptas e dos vilos do jejuno das poedeiras foram analisados por imunohistoquímica para PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

A parafina foi removida dos cortes por passagens em banhos de xilol e os cortes foram reidratados em séries decrescentes de etanol (99 a 70°), seguido de água destilada. Os reagentes utilizados na imunohistoquímica são do kit EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab94710) (Abcam®, CAbridge, MA, USA).

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pelo Hidrogen peroxide block do kit, por 10 minutos. Então os cortes foram encaminhados ao microondas com 70% de sua potência, em tampão citrato pH 6,0 e 0,1M, por 15 minutos, ficando em repouso por 15 minutos para esfriar. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com pré-incubação pelo Protein Block do mesmo kit, por 10 minutos, em câmara úmida.

O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo policlonal feito em coelhos anti-PCNA (FL-261) contra os aminoácidos 1-261 do PCNA humano da Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, Ca, USA). Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-PCNA diluído 1:200, permanecendo nos cortes *overnight*, em câmara úmida a 4°C de temperatura. Os cortes foram lavados por 3 banhos de 5 minutos cada em PBS. A amplificação da reação do anticorpo primário foi efetuada usando anticorpo secundário anti-rabbit do kit, por 10 min em temperatura ambiente, seguido de lavagens em PBS e incubação com o Goat anti-rabbit HRP Conjugate do kit por 15 min.

Após lavagens em PBS, a reação foi visualizada através do DAB plus substrate + DAB cromógeno do kit, por 2-3 min. Os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com Hematoxilina e montados com Permount após desidratação em álcool crescente e xilol (5 minutos cada). A reação positiva foi visualizada pela cor marrom nos núcleos celulares. Como controle negativo o anticorpo primário foi omitido dos cortes e substituído por PBS.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2004). Após a análise de variância, quando houve diferença, os graus de liberdade foram desdobrados em polinômios e analisados por regressão para as diferentes relações linear ou quadrática ($P < 0,05$). Para as variáveis respostas que apresentaram resposta quadrática foram calculados o ponto de inflexão, como as melhores relações, e 95% destes valores como limite de confiança. As comparações entre as médias das variáveis estudadas para o grupo controle e os tratamentos foram realizadas utilizando o teste de comparação de médias de Dunnet ($P < 0,05$).

O modelo estatístico para as análises dos dados produtivos, ósseos e intestinais, foi:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1X_i + b_2X_i^2 + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = valor observado da variável estudada j, submetido ao tratamento i

X_i = Níveis de suplementação de ácido L-glutâmico (0%, 0,2%, 0,4%, 0,6% e 0,8%)

b_0 = média geral de todas as observações

b_1 = coeficiente linear de regressão de Y_{ij} , em função do nível de ácido L-glutâmico

b_2 = coeficiente quadrático de regressão de Y_{ij} , em função do nível de ácido L-glutâmico

e_{ij} = erro experimental

Para as análises sanguíneas, o modelo utilizado foi:

$$Y_{ij} = b_0 + H_i + X_j + HX_{ij} + e_{ijx};$$

Em que:

Y_{ij} = valor observado da variável estudada j, no horário i

b_0 = média geral de todas as observações

H_i = Horários de Coleta de Sangue (16h, 03h e 12h)

X_j = Níveis de suplementação de ácido L-glutâmico (0%, 0,2%, 0,4%, 0,6% e 0,8%)

HX_{ij} = Interação entre o nível suplementação j com o horário de coleta i

e_{ij} = erro experimental

As análises estatísticas para soro sanguíneo foram realizadas através de comparações entre as médias das variáveis em função do horário de coleta do sangue utilizando o teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância e entre os níveis estudados e o grupo controle e os tratamentos suplementados pelo teste de Dunnet.

Resultados e Discussões

Os resultados de desempenho produtivo de poedeiras comerciais com idade de 53 a 69 semanas de idade, suplementadas com níveis crescentes de Glu estão demonstrados na Tabela 2. Com relação à análise de regressão realizada entre os níveis de adição de Glu, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre as variáveis analisadas para desempenho produtivo. Por outro lado, a percentagem de cálcio na casca aumentou significativamente ($P > 0,05$) ($Y = 29,6221 + 2,0046X - R^2 = 0,87$), em função dos níveis de Glu (Figura 1).

Apesar de não terem sido observadas diferenças em relação no peso da casca, na espessura e na força de quebra da casca entre os tratamentos, a adição de Glu proporcionou um incremento da quantidade de cálcio da mesma, sinalizando que houve incremento metabólico nos processos de excreção de cálcio pelo útero e de fixação deste na casca, sem ter prejuízo ao esqueleto destas aves. Este incremento pode ser resultado de maior disponibilidade de cálcio circulante durante o período de deposição da casca, aliado a maior absorção intestinal do mesmo.

Tabela 2. Valores médios de desempenho produtivo e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais no período de 53 a 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.

Variáveis Analisadas	Nível de Glu					Média	CV%	Efeito
	2,679	2,879	3,079	3,279	3,479			
% Postura	82,10	81,72	77,83*	81,33	81,40	81,00	2,19	NS
Consumo diário (g/ave/dia)	94,92	95,48	94,30	95,61	95,54	95,23	1,75	NS
Peso ovos (g)	65,31	65,82	65,08	65,34	65,60	65,43	0,71	NS
Massa ovos/dia (g)	53,58	53,25	49,58*	52,49	52,95	52,27	2,21	NS
Peso Específico ovo (g/cm ³)	1,079	1,078	1,079	1,081	1,079	1,079	0,294	NS
Conversão Alimentar (kg/dz)	1,38	1,40	1,47*	1,41	1,42	1,42	0,05	NS
Conversão Alimentar (kg/kg)	1,77	1,79	1,89*	1,82	1,82	1,82	0,07	NS
Unidade Haugh	86,51	86,61	86,40	86,79	87,50	86,76	1,57	NS
% Casca nos ovos	8,57	8,43	8,48	8,44	8,51	8,49	0,16	NS
Espessura de Casca (mm)	0,362	0,354	0,364	0,358	0,363	0,360	1,89	NS
Resistência da Casca (kgf)	3,48	3,42	3,62	3,47	3,51	3,51	0,19	NS
% Cálcio na Casca	35,97	35,23	35,93	36,43	36,42	35,98	0,80	L ¹
% Matéria Mineral na Casca	84,19	83,32	85,64	86,18	83,23	84,50	4,34	NS

* diferença das médias dos tratamentos em relação ao controle, pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$);

L – Efeito Linear. 1 - % de Cálcio na Casca = $29,6221 + 2,0046x$ ($P = 0,0031$) ($R^2 0,87$)

NS – Efeito não significativo

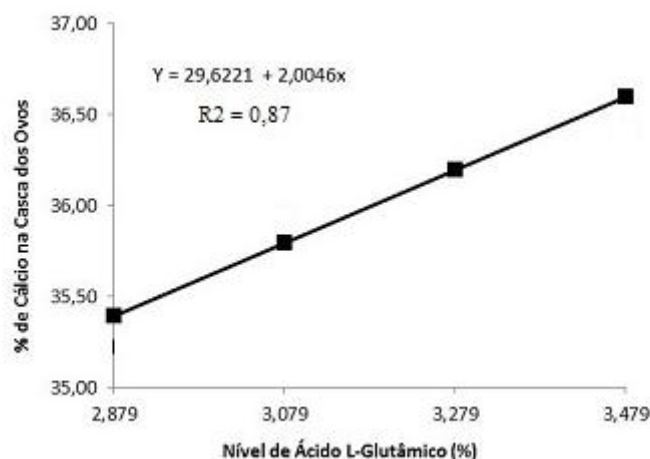


Figura 1 – Comportamento do percentual de cálcio na casca de ovos de poedeiras comerciais no período de 53 a 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido L-glutâmico.

Os dados médios para as análises de qualidade óssea do tibiotarso de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade estão representadas na Tabela 3. Com relação à análise do tibiotarso das poedeiras, quando os dados foram comparados entre o tratamento controle e os tratamentos com níveis de inclusão de Glu, não houve efeito de nenhuma das variáveis estudadas quando analisadas pelo teste de Dunnet. No entanto, a regressão entre os níveis de adição de Glu teve comportamento quadrático ($P > 0,05$) para o índice de Seedor e a robustez do tibiotarso ($Y = 89,754 - 7,777x$; $R^2 = 0,92$) e ($Y = 47,211 + 2,592x$; $R^2 = 0,93$), respectivamente. Acredita-se que o tibiotarso teve incremento na constituição não mineralizada, demonstrada pelos efeitos lineares crescentes de robustez dos ossos. O fato de não ter variação no teor de matéria-mineral, de cálcio e de fósforo nos ossos, corroboram com a hipótese de que houve melhora no teor de proteínas não-colagenosas que contribuíram para maior peso e conseqüentemente, maior robustez óssea. Os resultados encontrados neste experimento indicam que houve melhora na fração não mineralizada dos ossos.

Tabela 3. Médias referentes a qualidade óssea de Tíbiotarsos de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.

Variáveis Analisadas	Nível de Glu					Média	CV%	Efeito
	Níveis Suplementados							
	2,679	2,879	3,079	3,279	3,479			
Peso Relativo	0,50	0,48	0,46	0,48	0,46	0,47	7,87	NS
Comprimento (mm)	112,58	113,22	111,94	113,75	113,27	112,95	3,02	NS
Diâmetro (mm)	6,65	6,895	6,64	6,62	6,68	6,70	6,16	NS
Índice de Seedor (mg/mm)	66,50	66,89	66,33	64,71	62,21	65,03	5,35	L ¹
Resistência (kgf)	19,38	18,57	20,68	19,23	21,62	19,90	32,77	NS
Índice de Robustez	54,80	54,85	54,96	55,64	56,36	55,45	2,09	L ²
% Matéria Mineral Tíbiotarso	51,57	52,61	53,72	53,93	49,38	52,24	8,57	NS
% Cálcio na Matéria Mineral	27,72	27,98	27,08	27,07	26,03	27,18	14,95	NS
% Fósforo na Matéria Mineral	15,34	14,49	14,10	14,44	13,20	14,31	23,53	NS
Relação Ca:P na Matéria Mineral	1,83	1,94	1,93	1,89	1,83	1,88	7,99	NS
Densitometria (mmAl)	2,24	2,19	2,20	2,16	2,17	2,15	8,29	NS

* diferença das médias dos tratamentos em relação ao controle, pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$);

L – Efeito Linear. 1 – Índice de Seedor = $89,754 - 7,777x$ ($R^2 = 0,92$) ($P = 0,0226$); 2 – Índice de Robustez = $47,211 + 2,592x$ ($R^2 = 0,93$) ($P = 0,0226$);

NS – Efeito não significativo

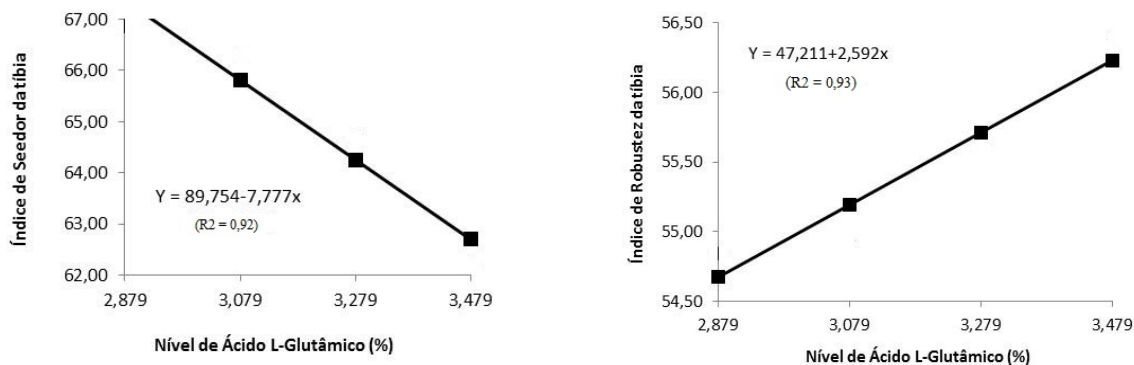


Figura 2 – a) Índice de Seedor de Tíbiotarsos de poedeiras comerciais no período de 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu. 2b) Índice de Robustez de Tíbiotarsos de poedeiras comerciais no período de 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.

A maior diminuição da resistência óssea, em poedeiras com idade média de 50 semanas de produção implica em perdas consideráveis do osso cortical (Whitehead e Fleming, 2000). A perda do osso cortical é crítica, uma vez que a ave não tem como repor durante o ciclo de postura (Taylor e Dacke, 1984).

De acordo com Silva *et al.* (2002), trabalhando com suplementação de Glu, em dietas purificadas, para pintos de corte, os níveis de 10 e 12,5% de L-Glu foram necessários para otimizar o crescimento, para o ótimo conteúdo da matriz orgânica de ossos e redução de problemas de pernas.

O declínio no osso estrutural e trabecular não causam mudanças nas dimensões externas dos ossos longos uma vez que a reabsorção do osso cortical é confinada à superfície endosteal. Entretanto, o afinamento do osso cortical e a perda da integridade do osso trabecular resultam em ossos quebradiços e mais susceptíveis a fraturas (Gregory e Wilkins, 1989).

Os resultados referentes às enzimas sanguíneas e os íons circulantes no soro de poedeiras comerciais as 69 semanas de idade estão demonstrados na Tabela 4. A adição de Glu não influenciou os níveis de cálcio, fósforo e fosfatases ácida e alcalina no soro de

poedeiras e não houve interação entre os níveis de Glu e o horário da coleta do soro sanguíneo. Já o horário da coleta do soro apresentou efeito isolado. As coletas compreenderam os períodos de início (16h) e finalização (03h) da deposição da casca do ovo no útero e o período de trânsito do próximo ovo entre o infundíbulo e o magno (12h). As variações observadas foram esperadas em função de que, fisiologicamente, ocorrem flutuações dos níveis de cálcio e fósforo e na atividade das enzimas fosfatases, que estão relacionadas com a deposição e com a reabsorção de cálcio do tecido ósseo.

Tabela 4. Valores médios de enzimas sanguíneas e íons circulantes de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu e do horário de coleta.

	FAC (U/L)	FAL (U/L)	CaT (mg/dL)	CaI (mg/dL)	PI (mg/dL)
Glu					
2,679 %	7,00	387,39	14,51	10,75	5,29
2,879 %	6,22	350,16	14,67	10,82	5,51
3,079 %	6,49	341,96	15,04	11,06	6,84
3,279 %	5,61	371,95	14,72	10,87	5,73
3,479 %	6,83	371,54	14,96	11,09	6,39
Média	6,39	362,98	14,80	10,93	6,00
Hora Coleta					
16h	7,24	406,29	15,13a	11,13a	6,23a
03h	5,569	359,38	15,64a	11,56a	7,13a
12h	6,563	331,96	13,69b	10,15b	4,68b
Média	6,28	358,72	14,80	10,87	6,20
CV%	56,87	31,73	8,25	8,26	33,04
Efeito					
Glu	NS	NS	NS	NS	NS
Horário	NS	NS	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
Glu vs horário	NS	NS	NS	NS	NS

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

NS – Não significativo

FAC – Fosfatase Ácida; FAL – Fosfatase Alcalina; CaT – Cálcio total; CaI – Cálcio Iônico; PI – Fósforo Iônico.

Para as enzimas sanguíneas avaliadas fosfatase ácida e fosfatase alcalina foram observados comportamento constante, independente do nível de suplementação. Valores semelhantes aos achados neste experimento, para a enzima fosfatase alcalina, foram encontrados nos estudos realizados por Garlich (1974), corroborando com os achados. A hipótese de que haveria diferenciação na quantidade das enzimas estudadas, não foi confirmada com os resultados encontrados neste experimento. Valores próximos, para fosfatase alcalina, foram também encontrados por Silva *et al.* (2001), trabalhando com pintos de corte na fase inicial, experimento no qual foi avaliada suplementação de Glu na dieta destes animais.

Os íons circulantes cálcio (Iônico e Total) e fósforo apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) apenas quanto ao horário de coleta. Os níveis de cálcio total, cálcio iônico e fósforo iônico diferiram significativamente na coleta das 03h apresentando maiores níveis séricos, sendo 11,556 mg/dL, 15,642 mg/dL e 7,132 mg/dL, respectivamente. Não houve interação entre os níveis de suplementação e os horários das coletas. Os valores de cálcio total e fósforo iônico são confirmados quando comparados às análises realizadas por Ghise *et al.* (2009) e Clunies *et al.* (1992), os quais avaliaram os parâmetros bioquímicos e hematológicos de poedeiras durante o período de postura e em pico de produção.

De acordo com Etches (1987), o nível de fósforo inorgânico é maior durante o período de calcificação da casca do que quando o útero se encontra inativo, confirmando os dados encontrados neste trabalho. Valores de fósforo inorgânico semelhantes aos deste experimento foram encontrados por Duarte *et al.* (2002), que encontraram o nível médio de 6,20 mg/dL de fósforo inorgânico em poedeiras Dekalb Warren, com 30 semanas de idade, em pico de produção de ovos.

O cálcio iônico observado nas poedeiras representou em média 73,3% do cálcio total. A mesma proporção foi observada em frangos de corte com 21 dias por Silva *et al.* (2001).

Segundo Bar (2009), o aumento da absorção de cálcio no intestino, durante o período de formação da casca não é suficiente para satisfazer o alto requerimento do Ca. A duração da taxa de passagem da ingesta através do esôfago (3h), moela (1h) e intestino (3 às 4h) e o fato da maioria do Ca ser absorvido no intestino, durante os primeiros 75 a 78 minutos após deixar a moela, é evidente que 6 a 10 horas após a interrupção da dieta, o intestino da poedeira estará sem cálcio. Como a ingestão de alimentos para na primeira hora de escuro, e como a calcificação da casca ocorre, principalmente durante o período sem luz, uma porção considerável de cálcio deve ser mobilizada das reservas ósseas. Uma estimativa desta proporção é de 20 a 40 % de todo o cálcio da casca.

Durante a etapa de calcificação da casca do ovo nas poedeiras, em torno de 2,4g de cálcio são necessários em aproximadamente 20 h para produzir a casca de um ovo de peso médio de 60g. Apenas 60 a 70 % do cálcio da casca podem ser providos via alimentação, o restante, deve ser mobilizado das reservas corporais (Driggers e Comar, 1949). A calcificação de cada casca é acompanhada pela reabsorção óssea, associada com uma intensa atividade osteoclástica e logo após a postura do primeiro ovo, as fases de reabsorção óssea, dão lugar à formação óssea (Mueller *et al.* 1964).

Nos períodos com luz natural ou artificial, a poedeira, através da ingestão de cálcio da dieta, mantém seu organismo em homeostase. No período da noite, em que não há oferecimento de cálcio, caso a poedeira esteja formando a casca do ovo, há uma mobilização óssea, o suficiente para evitar má calcificação da casca. Após a postura do ovo, os osteoblastos são ativados e regeneram o osso medular. Embora o osso medular seja importante para a formação da casca, não há nenhuma relação direta entre ele e a quantidade de casca (Whitehead, 2004).

Os dados de morfometria do jejuno das poedeiras com 69 semanas estão representados na Tabela 5. Quando os dados foram analisados pelo teste de Dunnet em relação ao

tratamento controle nenhuma das variáveis, apresentou diferente efeito. Porém, quando realizada a regressão entre os níveis suplementados de Glu, a profundidade de cripta do jejuno teve efeito quadrático ($P < 0,05$) ($Y = 2170,466 - 1284,890X + 203,987 X^2$ ($R^2 = 0,64$), com ponto de inflexão com 3,149 de Glu (Figura 4).

Tabela 5. Valores médios de qualidade intestinal de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação Glu.

Variáveis	Nível de Glu					Média	CV%	Efeito
	2,679	2,879	3,079	3,279	3,479			
Peso Intestino (%)	2,35	2,37	2,22	2,07	2,26	2,26	15,54	NS
Comp.intestino (mm)	128,00	141,33	133,67	123,00	138,00	132,80	9,12	NS
Altura Vilo (μm)	703,56	688,81	625,08	677,73	748,42	680,23	21,35	NS
Largura Vilo (μm)	101,89	97,43	89,82	83,41	106,59	94,86	16,99	NS
Profun.cripta (μm)	135,34	159,41	154,72	140,67	173,67	156,06	10,09	Q ¹
Relação Vilo:Cripta	5,21	4,37	4,05	4,82	4,31	4,51	22,31	NS

* diferença da média do tratamento em relação ao controle, pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$);

Q – Efeito quadrático. 1 – Profundidade da Cripta = $2170,466 - 1284,890 x + 203,987 x^2$ ($R^2 = 0,24$)

NS – Não significativo

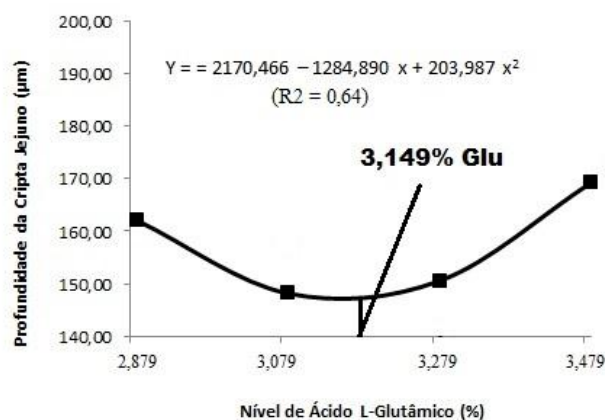


Figura 3 – Profundidade de cripta do jejuno de poedeiras de poedeiras comerciais com 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de Glu.

O desenvolvimento da mucosa intestinal é resultado da renovação celular proporcionada pela proliferação e diferenciação na cripta e ao longo do vilo (Uni *et al.* 1998). De acordo com Reeds *et al.* (2000) o Glu é o substrato mais importante para o

desenvolvimento do trato gastrointestinal. Pôde-se observar que o resultado encontrado neste experimento, comprova os achados dos referidos autores, uma vez que, a profundidade de cripta é uma das variáveis fundamentais quanto à qualidade intestinal. Um aumento na profundidade da cripta intestinal leva a maior capacidade de absorção dos nutrientes da dieta, como o cálcio, contribuindo para melhor manutenção do cálcio circulante e menor retirada das reservas ósseas.

Diferentes métodos são utilizados para o estudo da cinética de proliferação celular, dentre eles a imunohistoquímica para o PCNA, antígeno nuclear da proliferação celular (Rabenhorst *et al.* 1993).

A análise dos resultados da imunohistoquímica para PCNA nos vilos do jejuno demonstrou qualitativamente que a adição de Glu, interferiu nesta característica, conforme demonstrado nas Figuras 5 e 6. A observação ao microscópio de luz evidenciou em todos os tratamentos atividade proliferativa nas criptas e na base dos vilos do jejuno das poedeiras com 69 semanas. No entanto, os tratamentos 3, 4 e 5 apresentaram maior porção do vilos intestinal com núcleos marcados positivamente para PCNA (Figura 6). Em especial nos tratamentos 4 e 5 foram observados núcleos positivos para PCNA, nos vilos a partir da base, incluindo núcleos positivos na extremidade dos vilos (Figura 5). Nos tratamentos 2 e 3, foram observados núcleos positivos em aproximadamente 1/3 dos vilos a partir da base. Nos controles negativos, em que se omitiu o anticorpo primário na etapa correspondente, os núcleos não apresentaram reação, demonstrando a especificidade do anticorpo utilizado.

Segundo Uni *et al.* (1998) as células tronco das criptas do intestino delgado de mamíferos se diferenciam predominantemente em enterócitos, que migram para os vilos até serem expulsos para a luz do intestino na extremidade do vilos. Durante essa migração as células adquirem funções. Em frangos, diferente do que ocorre em

mamíferos, é descrito que os enterócitos apresentam atividade proliferativa não somente nas criptas e o exato local em que ocorre a diferenciação ainda não é preciso. Células positivas para PCNA na extremidade dos vilos intestinais também foram descritas por Uni *et al.* (1998), em frangos de corte.

A maior profundidade de cripta observada associada a maior proporção de células reativas ao PCNA nos tratamentos com adição de Glu na dieta das poedeiras evidenciam que houve aumento da atividade proliferativa no jejuno destas aves levando a maior capacidade de regeneração da mucosa. Apesar de poedeiras criadas em gaiolas não sofrerem um desafio bacteriano, como ocorre em frangos de corte criados em cama, e da capacidade de absorção de nutrientes não ser tão exigida em função do rápido crescimento e ganho de peso que os frangos necessitam, poedeiras também precisam de manutenção de saúde intestinal para absorção de nutrientes da dieta.

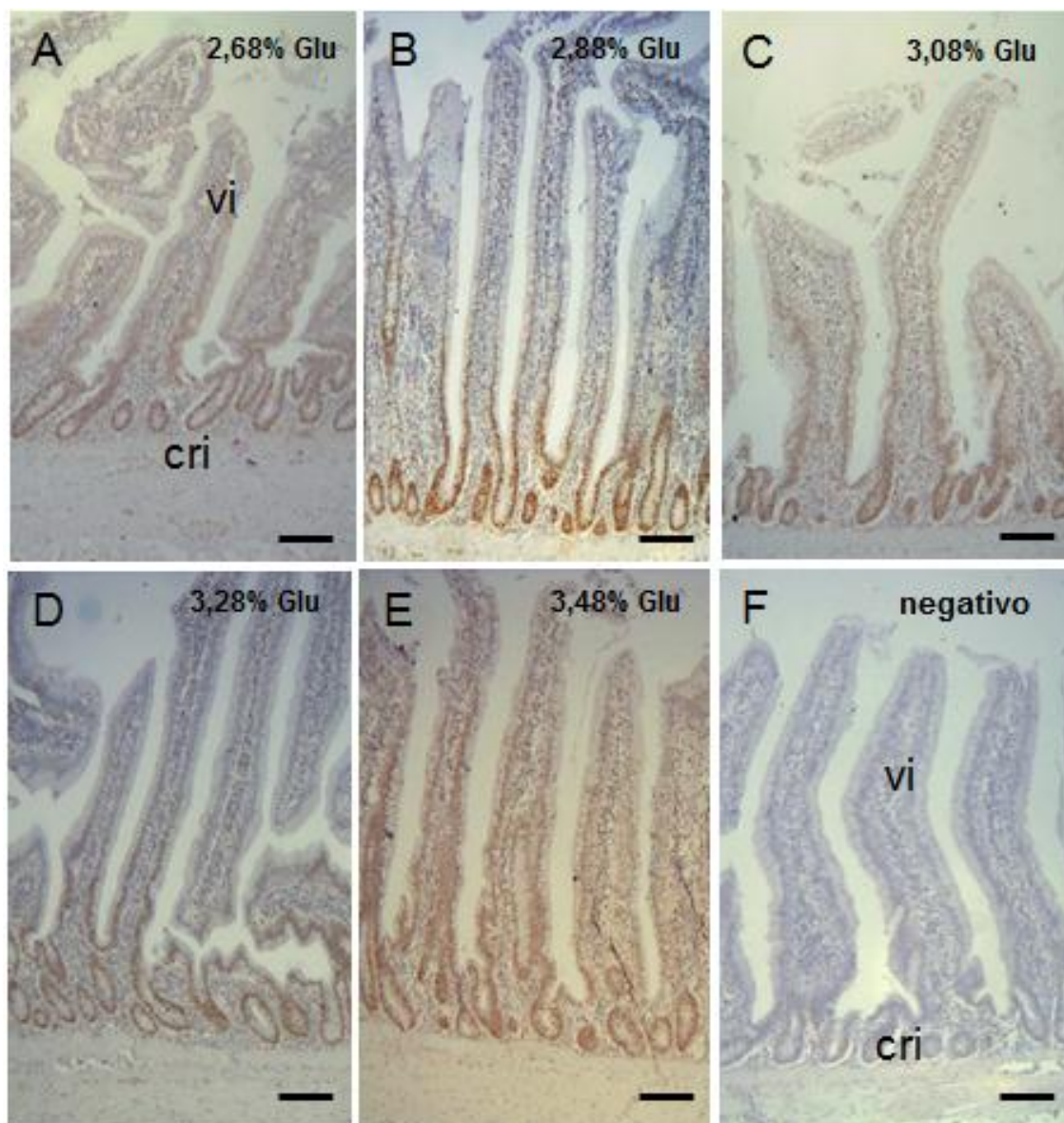


Figura 4. Jejunum de poedeiras comerciais no período de 69 semanas de idade em função do nível de suplementação de ácido l-glutâmico. A-E) Notar reação positiva (em marrom) para PCNA nos núcleos das células das criptas (cri) em todos os tratamentos e ao longo dos vilos intestinais (vi) que apresentaram mais células positivas em direção à extremidade do vilão à medida que se acrescenta ácido l-glutâmico à ração. F) Controle negativo em que se omitiu o anticorpo primário não apresentou imunorreatividade. Barra: 100μm.

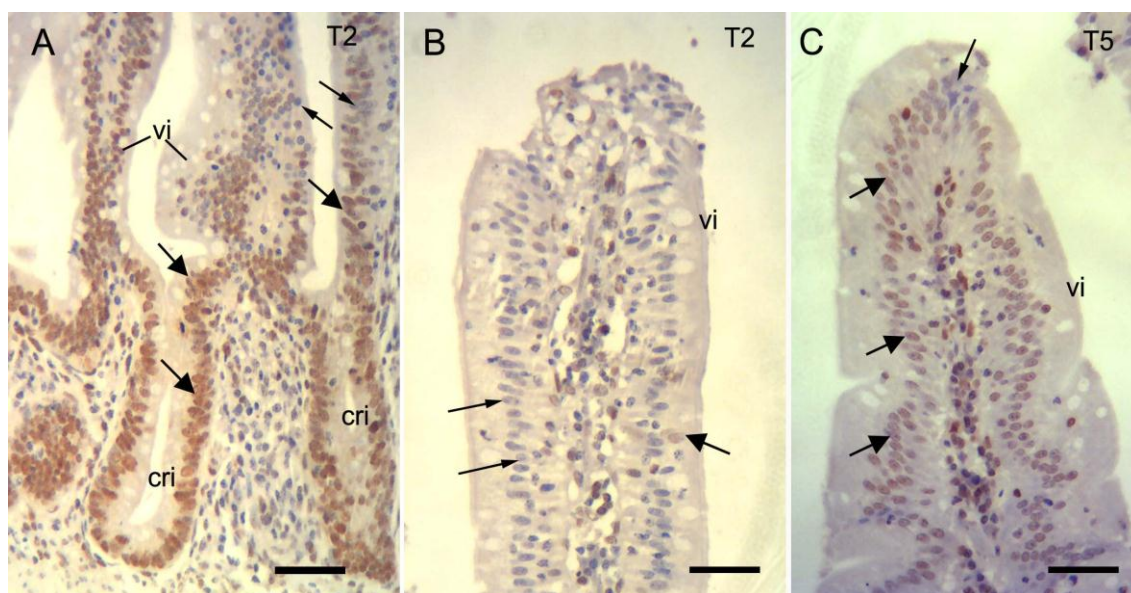


Figura 5. Jejunum de poedeiras comerciais no período de 69 semanas de idade. A) Observar corte transversal da cripta (cri) do jejunum com núcleos marcados para PCNA, visualizáveis em marrom (seta grossa) e a continuação da cripta pela superfície dos vilos (vi) em que também se observam células em proliferação PCNA positivas e alguns núcleos negativos visualizados em azul (seta fina). B-C) Notar que no T2 (B) extremidade dos vilos do jejunum apresentou qualitativamente menos células marcadas para PCNA (seta grossa) do que as observadas no tratamento com maior inclusão de Glu (C). A-B) 2,879% Glu; C) 3,479% Glu. Barra: 30 μ m.

De acordo com Uni *et al.* (2001), a proliferação celular, em frangos de corte, ocorre tanto na cripta como ao longo da vilosidade, 50 % das células em proliferação são encontradas na cripta, 32% no meio do vilo e 8 % na região apical da vilosidade.

Geyra *et al.* (2001) identificaram em frangos de corte da linhagem Ross, no momento da eclosão que, quase todas as células estavam em proliferação na cripta e ao longo do vilo, nos três segmentos intestinais. Entretanto, com a idade, o percentual de células PCNA positivas diminuiu, atingindo cerca de 50 % de células PCNA positivas na cripta e de 10 a 40 % no vilo, três dias após a eclosão. Estas informações contradizem o encontrado neste experimento, que pode ser observado grande percentual de células PCNA positivas ao longo do vilo e da cripta de poedeiras em idade avançada, sugerindo a ação do Glu na renovação celular.

Conclusões

A adição de Glu na dieta de poedeiras até 69 semanas de idade melhorou a deposição de cálcio na casca dos ovos, tornou o tibiotarso mais resistente e teve efeito qualitativo na proliferação dos enterócitos da mucosa do jejuno.

Referências Bibliográficas

Bar A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2009; 152:477-490.

Bartell SM, Batal AB. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poult Sci.* 2007; 86(9):1940-1947.

Burrin DG, Stoll B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90:850-856.

Clunies M, Parks D, Leeson S. Calcium and phosphorus metabolism and eggshell thickness in laying hens producing tick or thin shells. *Poultry Science* 1992; 71(3):490-498.

Dewald HA, Moore AM. 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine, a new tumor-inhibitory substance. Preparation of L-, D- and DL-forms. *J. Am. Chem. Soc.* 1958; 80(15):3941-3945.

Driggers JCE, Comar CL. The secretion of radioactive calcium in the hens egg. *Poultry Sci.* 1949; 28:420-424.

Duarte V, Quintino VL, Minafra CS, Oliveira PR, Santos FR, Perim FS. Perfil bioquímico do soro de poedeiras comerciais da linhagem dekalb warren no pico de produção. In: I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IFGoiano. 06 e 07 de novembro de 2012.

Etches RJ. Calcium Logistic in the laying hen. *Journal of Nutrition* 1987; 117:619-628.

Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem.* 1983; 258:12723-12727.

Garlich JD. Chicken serum alkaline phosphatase. *Poultry Science* 1974; 53:957-963.

Geyra A, Uni Z, Sklan, D. Enterocyte intestinal absorption in the young poult. dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Br. Poult. Sci.* 2001; 44:651-658.

Ghise A, Olaru L, Huto I, Zehan R, Ghise GH, Carpinisan L. Biochemical aspects of both the cortical bone and the medullary bone in hens at different stages of the egg formation. *Lucrati stiintifice Zootehnie si Biotechnology* 2009; 42:253-260.

Gregory NG, Wilkin LJ. Effect of slaughter on bleeding efficiency in chickens, *Journal of Science of Food and Agriculture* 1989; 47:13-20.

Haugh RR. The Haugh unit for measuring egg quality. *United States Egg Poultry Magazine* 1937; 43:552-555.

Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda Y. Glutamate signaling in peripheral tissue. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271:1-13.

Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hidroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J.* 1994; 302:175-179.

Mason DJ, Suva LJ, Genever PG, Patton AJ, Steuckle S, Hillam RA. Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents? *Bone* 1997; 20:199-205.

Moraes GHK, Rogler JC, Featherston WR. Effects of a nonspecific nitrogen deficiency on growth rate and leg problems in chicks. *Poultry Science* 1984; 63(2):344-353.

Monteagudo MD. *Acta Anatomica* 1997; v.1, p:160-195.

Muller WJ, Schraer H. Calcium metabolism and skeletal dynamics of laying pullets. *J. Nutr.* 1964; 84:20-36.

Murakami AE, Sakamoto MI, Natali MR, Souza LMG, Franco JRG. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. *Poult Sci.* 2007; 86:488-495.

Oliveira AFG. Estudo do padrão de crescimento ósseo em frangos de corte de diferentes grupos genéticos em duas densidades populacionais. [Dissertation]. Maringá (PR): Universidade Estadual de Maringá. 73p, 2006.

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal Glutamate Metabolism. *Journal of Nutrition* 2000; 130:978S-982S.

SAS Institute Inc. SAS/STAT Software for PC. n.Release 9.3. SAS Institute, 2011.

Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6:339-346.

Silva FA, Moraes GHK, Rodrigues ACP, Fonseca CC, Oliveira MGA, Albino LFT, Rostagno HS, Freitas HT. Composição química do soro de pintos de corte alimentados com dietas purificadas. *Rev. Bras. Zootec* 2002; 31(4):1783-1788.

Silva FA, Moraes GHK, Rodrigues ACP. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D3 no desempenho e nas anomalias ósseas de pintos de corte. *Rev. bras. zootec.* 2001; 30(6):2059-2066.

Stroband HW, Debets FM. The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of the juvenile grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Cell Tissue Res.* 1978; 187:181–200.

Taylor TG, Dacke CG. Calcium metabolism and its regulation. In “Physiology and biochemistry of the Domestic Fowl” Vol. 5, pp125-170 (Ed B.M. Freeman) Academic Press, London UK, 1984.

Uni Z, Gal-Garber A, Geyra D, Sklan NDS, Yahav IJI, Saki A, Tivey DR. Changes in growth and function of chick growth of broiler chicks on a commercial starter small intestine epithelium due to early thermal diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *conditioning. Poult. Sci.* 2001; 80:438-445.

Uni Z, Ganot S, Sklan D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science* 1998; 77(1):75-82.

Whitehead CC. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poultry Science* 2004; 83:193-199.

Whitehead CC, Fleming RH. Osteoporosis in cage layers *Poultry Science* 2000; 79: 1033-1041.

Yi GF, Allee GL, Frank JW, Spencer JD, Touchette KJ. Impact of glutamine, menhaden fish meal and spray-dried plasma on the growth and intestinal morphology of broilers. *Poult. Sci.* 2001; 80(Suppl. 1):201.

V- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar as funções extras do ácido l-glutâmico, sua influência na remodelação óssea e nos aspectos intestinais. Com base nisto, em virtude da escassa literatura em poedeiras com a suplementação deste aminoácido, este experimento foi conduzido, como pesquisa base para verificação das respostas desses animais, quanto às hipóteses levantadas de que poderia influenciar nas variáveis estudadas, foi possível verificar que o ácido l-glutâmico influencia em algumas características ósseas, bem como, em características intestinais e percentual de cálcio na casca dos ovos.

Algumas considerações podem ser feitas sobre este experimento, entre elas, pode-se citar que as aves poderiam ser acompanhadas desde o seu período de crescimento, podendo assim, ter todo o acompanhamento do desenvolvimento do tecido ósseo e monitoração do intestino. O fato de utilizar animais com idade inicial de 53 até 69 semanas pode ter contribuído para a não observação de resultados em outros parâmetros ósseos, uma vez que, os ossos já estavam formados em sua plenitude e a maior incidência de problemas de pernas em poedeiras se dá em idades mais avançadas do que neste período, sugerindo assim, que esta pesquisa venha a ser realizada com aves até o descarte. Os resultados encontrados demonstram que ocorrem efeitos no sistema ósseo, mas que com as metodologias empregadas não foi possível defini-las. A análise por densitometria óssea das aves vivas ou dos ossos obtidos poderia comprovar se houve ou não preservação do osso cortical durante o período, por ativação de células ósseas no osso medular para depósito e reabsorção de cálcio durante a formação da casca dos ovos.