

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ARGININA E LISINA  
SOBRE O CRESCIMENTO, IMUNIDADE E METABOLISMO  
MUSCULAR E ÓSSEO DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Jovanir Inês Müller Fernandes  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
novembro - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ARGININA E LISINA  
SOBRE O CRESCIMENTO, IMUNIDADE E METABOLISMO  
MUSCULAR E ÓSSEO DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Jovanir Inês Müller Fernandes  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração: Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
novembro - 2007

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

Fernandes, Jovanir Inês Müller

Efeito da suplementação de arginina e lisina sobre o crescimento, imunidade e metabolismo muscular e ósseo de frangos de corte / Jovanir Inês Müller Fernandes. -- Maringá : [s.n.], 2007.

167 f. : il., figs., tabs.

Orientadora : Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 2007.

1. Frango de corte - Qualidade óssea. 2. Arginina (aminoácidos). 3. Lisina (aminoácidos). 4. Sistema imune - Frango de corte. 5. Células satélite - Frango de corte. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 21.ed. 636.5085



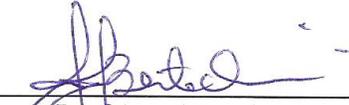
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

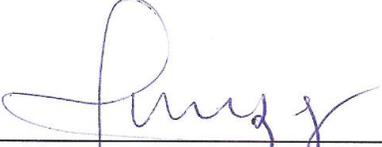
**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ARGININA E  
LISINA SOBRE O CRESCIMENTO, IMUNIDADE  
E METABOLISMO MUSCULAR E ÓSSEO  
DE FRANGOS DE CORTE**

Autora: Jovanir Inês Müller Fernandes  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

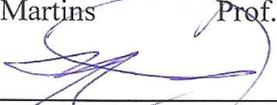
APROVADA em 09 de novembro de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antônio Gilberto  
Bertechini

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisabeth Gonzales

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Elias Nunes Martins

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudio Scapinello

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami  
(Orientadora)

## CAMINHAR

Às vezes o caminhar é lento, mas o importante é não parar.  
Mesmo um pequeno progresso é um avanço na direção certa.  
E qualquer um é capaz de fazer um pequeno progresso.  
Se você não pode conquistar algo importante hoje, conquiste algo menor.  
Pequenos riachos se transformam em rios poderosos.  
Continue em frente...  
O que de manhã parecia fora do alcance, pode ficar mais próximo  
à tarde se você continuar em frente.  
O tempo que usar trabalhando com paixão  
e intensidade aproximará você do seu objetivo.  
É bem mais difícil começar de novo se você pára completamente.  
Então, continue em frente...  
Não desperdice a chance que você mesmo criou.  
Existe algo que pode ser feito agora mesmo, ainda hoje.  
Pode não ser muito, mas fará com que você continue no jogo.  
Caminhe rápido enquanto puder.  
Caminhe lentamente quando for preciso.  
Mas, seja o que for, continue andando.  
E você conseguirá alcançar suas metas...  
Realizar seus planos, sonhos...  
Portanto, não desista, nunca!

Autor desconhecido

*Ao meu marido, Nelson, às minhas filhas Ana Júlia e Ana Paula  
e ao pequeno Matheus que está por chegar.....todo meu  
reconhecimento, amor e admiração por estarem sempre ao "meu  
lado", apesar de minhas constantes ausências....*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um momento em que precisamos de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente. Ninguém e nada crescem sozinhos; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão...

A todos vocês que compartilharam os meus ideais....

A mais profunda gratidão e respeito!

À Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina e à Universidade Estadual de Maringá, pela colaboração mútua que permitiu meu afastamento das atividades docentes e possibilitou a realização deste trabalho.

À orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alice Eiko Murakami, por sua valiosa orientação e direcionamento da pesquisa, por acreditar em cada etapa deste trabalho e pelo aconselhamento oportuno e a crítica construtiva que permitiu o meu enriquecimento profissional e pessoal, o devido reconhecimento e gratidão.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produção Animal da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de acesso ao conhecimento e à pesquisa, compartilhados de forma tão generosa no decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. Elias Nunes Martins, pelo exemplo de firmeza nos princípios e ideais de amor à pesquisa e ao ensino.

Ao Prof. Dr. Paulo C.F. Mathias e à Dr<sup>a</sup>.Clarice Gravena, do Departamento de Biologia Celular e Genética, pelo rigor e competência dedicados na condução da técnica de radioimunoensaio e pela agradável convivência.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandez, do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, pelo auxílio e orientação nas técnicas histológicas utilizadas neste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Fernandes, do Departamento de Biologia Celular e Genética, pela orientação nas análises de DNA do tecido muscular e por permitir a utilização de seu laboratório.

Aos Secretários do Curso de Pós-graduação, “Wal” e Denilson, pelas gentilezas concedidas e competência dedicada durante todo o período da Pós-graduação.

Às Técnicas do Laboratório de Histotécnica Animal da UEM, Maria Eurides e Maria dos Anjos, pela criteriosa orientação no preparo das amostras biológicas e execução das técnicas histológicas.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi da UEM, especialmente ao Célio Passolongo, pela eficiência e seriedade com que se dedica no cuidado das aves utilizadas nas pesquisas desenvolvidas no aviário experimental.

Ao Técnico do Laboratório de Histologia, Milton Rønnau e aos Técnicos do Laboratório de Nutrição Animal e Experimentação Avícola da UFPR - Campus Palotina, Neivair Pastore Sponchiado e Alaércio da Costa Freitag, pela excelente colaboração e paciência no processamento do material biológico.

Aos colegas da Pós-graduação, estudiosos das “penas e bico” e aos “aprendizes” do curso de Graduação em Zootecnia, pela competência e garra determinantes no laborioso trabalho de coleta e preparo do material biológico utilizado neste experimento: Luciana Maria, Márcia, Elis Regina, Suelen, Ana Paula, Luciana Otutumi, Luís Daniel, Helkin, Andréia, Ana Carolina, Mariela, Eliany, Rafael e Fábio, meu sincero agradecimento.

À Luciana Maria G.S. da Silva e à Márcia Isumi Sakamoto, pelo estreito convívio e por tudo que compartilhamos.....amizade, sonhos, conhecimentos e, principalmente, pelo apoio e carinho desprendidos a mim e a minha família.

Ao José Rodrigo Galli Franco, pelo constante incentivo, ajuda e sugestões sempre bem-vindos ao meu trabalho.

Ao casal Suelen e Maurício e às “meninas” Alessandra e Leticia, pela acolhida tão generosa e gentil em suas casas, meu carinho e gratidão.

Aos demais colegas da Pós-graduação, Cláudia Yurika, Ângela e Nelson, Carlão, Meiby, Marcos, Diovani, Paulo, Fernanda, Emilyn e Jaime pelos momentos tão alegres e por vezes tão angustiantes que compartilhamos no decorrer do curso, meu carinho e saudades.

Ao Nelson Luis Mello Fernandes, pelo incentivo constante, pelo respeito às minhas individualidades, apoiando-me, compreendendo-me, e, sobretudo pelo amor incondicional que nos une, meu eterno amor e reconhecimento são devidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

JOVANIR INÊS MÜLLER FERNANDES, filha de Irma Maria Müller e Jacob João Müller, nasceu em Palotina, Paraná, no dia 25 de fevereiro de 1969.

Em julho de 1992, concluiu o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Santa Catarina.

Em outubro de 1994, foi aprovada no Concurso Público para Pesquisador Científico no Instituto Biológico de São Paulo.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Nutrição Animal, na Universidade Estadual de São Paulo, onde no dia 14 de novembro de 1996, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

Em fevereiro de 1997, foi efetivada como Pesquisador Científico nível I, na Seção de Doenças Carenciais e Nutricionais do Instituto Biológico de São Paulo.

Em março de 1998, participou do Concurso Público para Professor Assistente da Universidade Federal do Paraná, sendo efetivada como docente do Curso de Medicina Veterinária no Campus Palotina.

Em fevereiro de 2004, iniciou o Curso de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de nutrição de frangos de corte.

No dia 09 de novembro de 2007, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Metabolismo da Arg</b> .....	4
1.1.1. Arg e a síntese de creatin .....	7
1.1.2. Arg e a síntese de ornitina, poliaminas e prolina .....	8
1.1.3. Arg e a síntese de óxido nítrico .....	11
<b>1.2. Considerações sobre o Hormônio do Crescimento e a Relação com a Arg ...</b>	15
<b>1.3. Considerações sobre a Ação Imunomodulatória da Arg como Precursor do Óxido Nítrico</b> .....	18
<b>1.4. Crescimento e Desenvolvimento do Músculo-Esquelético dos Frangos de Corte</b> .....	20
1.4.1. Desenvolvimento da fibra muscular esquelética .....	22
1.4.2. Desenvolvimento e metabolismo do tecido ósseo .....	25
<b>1.5. Interação Metabólica entre Lys e Arg no Desempenho Produtivo e no Rendimento e Qualidade da Carcaça de Frangos de Corte</b> .....	29
<b>Referências</b> .....	35
<b>II – OBJETIVOS GERAIS</b> .....	49
<b>2.1. Objetivos Específicos</b> .....	49
<b>III – Avaliação do Antagonismo entre Arginina e Lisina na Dieta Inicial sobre o Desempenho Produtivo e a Espessura da Pele de Frangos de Corte</b> .....	50

<b>Resumo</b> .....	50
<b>Abstract</b> .....	51
<b>Introdução</b> .....	52
<b>Material e Métodos</b> .....	54
<b>Resultados e Discussão</b> .....	58
<b>Conclusão</b> .....	69
<b>Referências</b> .....	69
<b>IV – Avaliação do Antagonismo entre Arginina e Lisina na Dieta Inicial sobre os Níveis Plasmáticos de IGF-I e o Desenvolvimento Ósseo de Frangos de Corte</b> .....	73
<b>Resumo</b> .....	73
<b>Abstract</b> .....	74
<b>Introdução</b> .....	75
<b>Material e Métodos</b> .....	77
<b>Resultados e Discussão</b> .....	81
<b>Conclusão</b> .....	97
<b>Referências</b> .....	98
<b>V – Efeito da Suplementação de Arginina na Dieta Inicial sobre o Desempenho Produtivo, o Desenvolvimento dos Órgãos Linfóides e a Morfometria da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte</b> .....	103
<b>Resumo</b> .....	103
<b>Abstract</b> .....	103
<b>Introdução</b> .....	105
<b>Material e Métodos</b> .....	107
<b>Resultados e Discussão</b> .....	110
<b>Conclusão</b> .....	122
<b>Referências</b> .....	123
<b>VI – Efeito da Suplementação de Arginina na Dieta Inicial sobre o Desenvolvimento do Músculo Peitoral, Diâmetro e Relação Proteína:DNA das Fibras Musculares Esqueléticas dos Frangos de Corte</b> .....	127
<b>Resumo</b> .....	127
<b>Abstract</b> .....	128
<b>Introdução</b> .....	129

<b>Material e Métodos</b> .....	131
<b>Resultados e Discussão</b> .....	135
<b>Conclusão</b> .....	142
<b>Referências</b> .....	142
<b>VII – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	146

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo III</b>	
Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) .....	56
Tabela 2. Análise de regressão dos parâmetros de desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	59
Tabela 3. Análise de regressão das medidas morfométricas das camadas da pele (epiderme e derme) de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	67
<b>Capítulo IV</b>	
Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) .....	79
Tabela 2. Análise de regressão dos parâmetros morfológicos do fêmur e da tíbia de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	82
Tabela 3. Análise de regressão dos parâmetros ósseos da tíbia de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	87
Tabela 4. Análise de regressão dos parâmetros sanguíneos (IGF-I e fosfatase alcalina) de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	90
Tabela 5. Análise de regressão das medidas da área total da cartilagem epifisária tibial e das medidas relativas (% em relação à cartilagem epifisária tibial) da zona de crescimento (zona de repouso e maturação) e da zona de cartilagem hipertrófica) de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	94

## Capítulo V

Tabela 1.	Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) .....	109
Tabela 2.	Médias e estimativas dos parâmetros de desempenho dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	111
Tabela 3.	Médias e estimativas dos pesos dos órgãos linfóides dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	115
Tabela 4.	Médias e estimativas da medida da área do tecido linfóide da bolsa cloacal (mm <sup>2</sup> ) de frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	115
Tabela 5.	Médias dos valores de peso e comprimento do intestino delgado dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	119
Tabela 6.	Médias e estimativas dos valores das medidas morfométricas da mucosa do intestino delgado (duodeno e jejuno) dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	120

## Capítulo VI

Tabela 1.	Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) .....	133
Tabela 2.	Médias e estimativas dos parâmetros de crescimento muscular do peito, diâmetro e relação proteína:DNA das fibras musculares esqueléticas de frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	136
Tabela 3.	Médias das características de rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade .....	141

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Capítulo I</b>	
Figura 1. Síntese de citrulina e ornitina em mamíferos .....	5
Figura 2. Ciclo da uréia em mamíferos .....	6
Figura 3. Principais vias de participação da Arg no metabolismo celular .....	7
Figura 4. Via bi-cíclica proposta para a síntese de uréia e creatina no fígado de mamíferos .....	8
Figura 5. Metabolismo da Arg, ornitina e citrulina em células de mamíferos .....	10
Figura 6. Relacionamento entre a atividade da arginase (I e II) e a atividade da NOS .....	15
<b>Capítulo III</b>	
Figura 1. Peso vivo e consumo de ração de frangos de corte no período de 1 a 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	60
Figura 2. Consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 14 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	61
Figura 3. Peso vivo, consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	62
Figura 4. Valores corrigidos de mortalidade de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	65

Figura 5.	Peso vivo, consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	66
-----------	--	----

Figura 6.	Espessura da derme de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	68
-----------	---	----

#### Capítulo IV

Figura 1.	Diâmetro do fêmur dos frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	83
-----------	---	----

Figura 2.	Diâmetro da tíbia dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	84
-----------	---	----

Figura 3.	Índice de Seedor do fêmur dos frangos de corte aos 7 (A) e 21 (B) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	85
-----------	---	----

Figura 4.	Índice de Seedor da tíbia dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	86
-----------	---	----

Figura 5.	Espessura do osso cortical da tíbia dos frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial ....	88
-----------	--	----

Figura 6.	Resistência óssea à quebra da tíbia dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	89
-----------	---	----

Figura 7.	Atividade da fosfatase alcalina sérica dos frangos de corte aos 7 (A) e 42 (B) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	91
-----------	--	----

Figura 8.	Níveis plasmáticos do IGF-I dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	93
-----------	---	----

Figura 9.	Área total da cartilagem epifisária e medida relativa da zona de cartilagem hipertrófica da tíbia de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	95
-----------	---	----

Figura 10.	Área total da cartilagem epifisária e medidas relativas da zona de crescimento (zona de repouso e maturação) e da zona de cartilagem hipertrófica da tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial .....	96
------------	---	----

#### Capítulo V

Figura 1.	Peso vivo e conversão alimentar de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	113
-----------	---	-----

Figura 2.	Conversão alimentar de frangos de corte aos 14 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	113
Figura 3.	Peso vivo e conversão alimentar de frangos aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	114
Figura 4.	Peso dos órgãos linfóides de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	117
Figura 5.	Peso do timo dos frangos de corte aos 14 e 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	118
Figura 6.	Medida da área de tecido linfóide da bolsa cloacal dos frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	119
Figura 7.	Relação vilos:cripta e profundidade das criptas do duodeno dos frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	122
Figura 8.	Altura dos vilos do jejuno e profundidade das criptas do duodeno dos frangos de corte aos 14 e 42 dias alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	122

## Capítulo VI

Figura 1.	Peso do peito, de peso do filé e da espessura do filé do peito de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	137
Figura 2.	Peso do filé do peito de frangos de corte aos 14 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	137
Figura 3.	Peso do peito, de peso do filé e da espessura do filé do peito de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	138
Figura 4.	Diâmetro da fibra muscular do peito de frangos de corte aos 14 e 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial .....	138

## RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos com o objetivo de estudar o efeito da suplementação de arginina (Arg) e lisina (Lys), na dieta inicial, sobre as características produtivas, o metabolismo e crescimento ósseo, o desenvolvimento muscular e dos órgãos linfóides e a morfometria da pele e mucosa intestinal de frangos de corte. No primeiro experimento, o objetivo foi avaliar o efeito do antagonismo entre Arg e Lys sobre os parâmetros zootécnicos, a morfometria da pele e os níveis plasmáticos do IGF-I e seu reflexo sobre o metabolismo e crescimento ósseo dos frangos de corte. Foram utilizados 1.760 pintos de corte, Cobb, machos, os quais foram alocados aleatoriamente de acordo com um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial quatro x quatro (níveis de Lys e Arg) totalizando 16 tratamentos com duas repetições e 55 aves por unidade experimental. As dietas iniciais foram formuladas para conter 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível. Aos 21 dias, foi observada interação ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de Lys e Arg para o peso vivo e a conversão alimentar, demonstrando que níveis de Lys acima do recomendado deprimem o peso das aves, mas este efeito pode ser contornado pela adição de níveis extremamente altos de Arg. O desempenho das aves, na fase de crescimento (22 a 42 dias), foi influenciado pela suplementação na dieta inicial. A taxa de mortalidade aumentou ( $p < 0,05$ ) em resposta à suplementação de ambos os aminoácidos. Por outro lado, a combinação de níveis acima da exigência de ambos os aminoácidos na fase inicial contribuiu positivamente ( $p < 0,05$ ) na espessura da camada da derme da pele dos frangos de corte na idade de abate, provavelmente pelo envolvimento de Arg e Lys na biossíntese do colágeno. Níveis excessivos de aminoácidos interferem no desempenho em consequência do desequilíbrio na dieta e do maior gasto energético para sua biotransformação e eliminação. O excesso de Lys, ainda, pode estar envolvido com a degradação da Arg em

ornitina e uréia, o que pode alterar a síntese de óxido nítrico. A adição de Arg contribuiu ( $p < 0,05$ ) com o aumento do diâmetro, da densidade e da espessura óssea. Entretanto, níveis excessivos de Arg, na fase inicial, levaram ao aumento ( $p < 0,05$ ) da área hipertrófica da placa de crescimento e da atividade da fosfatase alcalina na idade de abate. Por outro lado, a Lys afetou positivamente ( $p < 0,05$ ) a resistência óssea à quebra, mas também pode contribuir negativamente com a ocorrência da discondroplasia tibial. Este efeito positivo da Lys sobre o tecido ósseo pode estar relacionado à produção de colágeno como reflexo do aumento ( $p < 0,05$ ) dos níveis plasmáticos de IGF-I pela suplementação de Lys. Arg não alterou IGF-I, provavelmente, devido à degradação pela Lys, o que inibiu seu papel secretagogo descrito em mamíferos. Os parâmetros ósseos avaliados, no final da fase de crescimento (22 a 42 dias), foram influenciados pela suplementação na dieta inicial. No segundo experimento, o objetivo foi avaliar o efeito da suplementação de Arg, em diferentes níveis, sobre comportamento das características produtivas, o desenvolvimento da fibra muscular esquelética e dos órgãos linfóides e na morfometria da mucosa intestinal de frangos de corte. Foram utilizados 990 pintos de corte, Cobb, machos, os quais foram alocados aleatoriamente de acordo com um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições de 33 aves cada. Os tratamentos consistiram de uma dieta basal com 1,390% de Arg digestível (sem suplementação) e quatro níveis suplementares (1,490%; 1,590%; 1,690% e 1,790%), mantendo uma relação com a Lys de 1,103; 1,183; 1,262; 1,341 e 1,421%, respectivamente. A suplementação de Arg melhorou ( $p < 0,05$ ) o peso vivo e a conversão alimentar, sem alterar o consumo das aves na fase inicial. Entretanto, esse efeito não foi observado ( $p > 0,05$ ) ao final da fase de crescimento em que as aves não receberam suplementação dietética de Arg, indicando que a suplementação acima dos níveis recomendados pode ser necessária para que a ave expresse o seu máximo potencial de ganho de peso. O efeito positivo ( $p < 0,05$ ) da suplementação de Arg sobre o peso dos órgãos linfóides foi mais evidente na primeira semana para o baço e a bolsa cloacal, sendo que o timo ainda respondeu positivamente até o final da fase inicial. Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) da suplementação de Arg sobre o peso e comprimento do intestino delgado em nenhuma idade avaliada, no entanto houve aumento ( $p < 0,05$ ) da relação vilosidade:cripta do duodeno na primeira semana. O efeito positivo da suplementação de Arg, possivelmente, envolveu a formação de ornitina por meio da degradação de Arg e a biossíntese de poliaminas. Houve efeito ( $p < 0,05$ ) no peso do peito e filé e no diâmetro das fibras musculares, porém, não foi observado efeito ( $p > 0,05$ ) sobre a relação proteína/DNA, demonstrando que a Arg não interferiu na atividade mitótica das células satélite via ação

estimulatória sobre a secreção de IGF-I. Todavia, independente deste mecanismo, a Arg afetou positivamente o crescimento muscular na fase inicial. Não houve efeito ( $p>0,05$ ) da suplementação de Arg na fase inicial sobre o rendimento da carcaça dos frangos de corte aos 42 dias. A suplementação de Arg acima dos níveis atualmente recomendados para a fase de crescimento pode ser necessária no desenvolvimento muscular dos frangos de corte.

Palavras-chave: aminoácidos, IGF-I, qualidade óssea, sistema imune, células-satélite

## ABSTRACT

Effect of arginine (Arg) and lysine (Lys) supplementation was evaluated in two trials during the initial diet on the productive characteristics, metabolism and growth bone, muscle and lymphoid organ development and skin and intestine morphometrics of broiler chickens. The first trial evaluated the effect of antagonism between Arg and Lys on performance, skin morphometrics and plasma levels of IGF-I and its consequences on the metabolism and growth bone of broiler chickens. One thousand seven hundred and seventy-six male Cobb broilers were reared in a randomized factorial four x four design (Lys and Arg levels) with two replications of 55 birds each. Experimental diets were formulated to contain 1.189%; 1.427%; 1.665% and 1.902% digestible Lys levels and 1.217%; 1.416%; 1.615% and 1.814% digestible Arg levels. Arg level addition increased the diameter, density, bone's total cortical thickness. However, extreme levels of Arg in the initial phase increased ( $p < 0.05$ ) the hypertrophic zone cartilage of growth plate and alkaline phosphatase activity on the 42<sup>nd</sup> day. On the other hand, the lysine positively affected ( $p < 0.05$ ) bone strength, although it may have also contributed negatively towards tibial dyschondroplasia. This positive effect of the lysine on bone tissue may be related to the production of collagen as seen by the increase ( $p < 0.05$ ) of IGF-I levels in Lys supplementation. Arg did not alter IGF-I, probably owing to Lys degradation, which inhibited their secretagogic role in mammals. Bone parameters evaluated at the finish of growth phase (22-42 days) were influenced by amino acids which supplemented the initial diet. There was an interaction ( $p < 0.05$ ) between Lys and Arg levels to weight gain and feed:gain ration, demonstrating that Lys levels above the recommended ones decreased broilers' weight. Such effect may be lowered by the addition of extremely high Arg levels. The productive characteristics in the growth phase (22 - 42 days) were affected by supplementation in the initial diet. Mortality increased ( $p < 0.05$ ) in response to Lys and Arg supplementation. On the other hand, the addition of levels above the

requirement of both amino acids in the initial phase contributed positively ( $p < 0.05$ ) towards the thickness of the 42-day-old broiler chickens' dermal skin layer. This is probably due to the involvement of Arg and Lys in collagen biosynthesis. Extreme amino acid levels may be harmful to performance owing to diet imbalance and highest energy expenditure in metabolism and excretion. Excess Lys may still be involved in Arg degradation in ornithine and urea, which modifies the nitric oxide synthesis. In the second trial, the effect of Arg supplementation in the initial diet on the behavior of productive characteristics, skeletal muscle fibers and lymphoid organ development and intestinal mucosa morphometrics of the broiler chickens was evaluated. Nine hundred and ninety male Cobb broilers were reared in a complete randomized design with five treatments and six replicates with 33 birds each. Dietary treatments consisted of one basal diet (Arg not supplemented) and four supplemental digestible Arg levels (1.390%; 1.490%; 1.590%; 1.690% and 1.790%), maintaining a relationship with Lys of 1.103; 1.183; 1.262; 1.341 and 1.421%, respectively. The addition of Arg levels improved ( $p < 0.05$ ) body weight and feed:gain ratio, without modifying the birds' consumption in the initial phase. However, this effect was not reported ( $p > 0.05$ ) till the end of the growth phase in which fowls did not receive Arg supplementation in the diet. Supplementation of recommended levels may be thus necessary so that the broiler chickens produce maximum performance. The positive effect ( $p < 0.05$ ) of Arg supplementation on lymphoid organ weight was more evident during the first week for spleen and Fabricius bursa, while the thymus still answered positively until the end of the initial phase. No effect ( $p > 0.05$ ) of Arg on the length and weight of the small intestine in any evaluated age was reported. However, relation vilo:cripta of the duodeno in the first week increased ( $p < 0.05$ ). These findings suggest that Arg supplementation improved these characteristics, probably by increasing ornithine levels, due to the extra substrate availability for polyamine synthesis. A positive effect ( $p < 0.05$ ) of dietary Arg supplementation was recorded on weight breast and breast fillet weight and diameter skeletal muscle fibers. There was, however, no significant effect on protein:DNA ratio which suggested that Arg levels did not activate the satellite cells via IGF-I. On the other hand, dietary Arg supplementation improved breast growth of chicks by the end of the initial phase. In the initial phase dietary Arg supplementation did not affect ( $p > 0.05$ ) carcass yield up to the 42<sup>nd</sup> day. Dietary Arg supplementation of the levels currently recommended for the growth phase may be required for the muscle development of broiler chickens.

Key words: amino acid, IGF-I, bone quality, immune system, satellite cells.

## I – INTRODUÇÃO

A avicultura, no cenário mundial, vem se mostrando uma das maiores potências econômicas da agropecuária pelo crescimento do consumo de aves em diversos países, impulsionada pelo emprego de tecnologias que otimizam a produção e geram alimento final mais barato, saudável e bem aceito pelo consumidor. Preocupações com a relação entre a ingestão de gordura e problemas coronários acentuam esta tendência, bem como a confirmação da preferência por carne branca.

Pelas condições de clima, qualidade, sanidade e abundante oferta de grãos, cresce a cada ano a importância da produção avícola no Brasil. As exportações de carne de frango cresceram 24,4% no primeiro semestre de 2007, em relação ao mesmo período de 2006 e a expressiva variação percentual é explicada pela acentuada queda nas exportações em 2006, quando o consumo internacional da carne de frango caiu em decorrência dos focos da gripe aviária na Europa e na Ásia.

Em função desse crescimento, o Brasil ocupa a posição de líder mundial na exportação de carne de frangos, com projeções para 2007 de embarques de 3 milhões de toneladas de aves (Avisite, 2007). O País produziu mais de 9,3 milhões de toneladas de carne de frango, 370 mil toneladas de carne de peru e 26,5 bilhões de ovos em 2006, abrangendo um mercado de mais de 140 países. Além dos volumes significativos, a avicultura destaca-se também pelo aumento da exportação de produtos com maior valor agregado.

A competitividade do mercado avícola é crescente e faz com que as empresas necessitem ajustar melhores resultados de qualidade e produção com o menor custo possível. Neste sentido, entre os aspectos fundamentais para que isso ocorra está o claro entendimento das necessidades dietéticas das aves nas diferentes fases da produção. A alimentação não só é responsável pelo maior custo individual do setor, mas também

interfere na qualidade dos produtos oferecidos ao mercado, evidenciando a grande importância da estratégia nutricional a ser utilizada.

Os alimentos protéicos têm grande contribuição neste custo total. A indústria de rações para animais tornou-se cada vez mais dependente das fontes vegetais de proteína, uma situação relacionada às fortes pressões internacionais, particularmente pela União Européia, ao proibir o uso de farinhas de origem animal como ingredientes das rações.

O desequilíbrio nutricional de uma ração pode ocasionar prejuízos ao desempenho dos animais. O consumo de aminoácidos essenciais e não essenciais, em quantidades excessivas, em proporção ou perfil, e em desproporção aos requeridos exigidos para ótima utilização nos tecidos, pode ser deletério ao metabolismo, principalmente quando o antagonismo entre aminoácidos é envolvido. O antagonismo entre arginina (Arg) e lisina (Lys) é uma interação que envolve aminoácidos estruturalmente semelhantes, sendo que o excesso de um eleva a exigência do outro (Jones, 1964; Austic & Scott, 1975).

O antagonismo entre Arg e Lys promove expressiva elevação da atividade da arginase renal e conseqüentemente induz à degradação da Arg (Austic & Scott, 1975) e leva à diminuição da atividade da glicina amidinotransferase, enzima que utiliza Arg e glicina como substratos juntamente com a metionina na síntese de creatina muscular (Jones *et al.*, 1967).

Trabalhos de pesquisa (Hickling *et al.*, 1990; Moran & Bilgili, 1990; Acar *et al.*, 1991; Holsheimer & Veerkamp, 1992; Leclerq, 1998) indicam que a suplementação de Lys acima das exigências para maior ganho de peso das atuais linhagens de frangos de corte, resulta em um efeito específico e significativo na otimização dos principais fatores econômicos na produção de frangos, a conversão alimentar relacionada ao custo alimentar e o rendimento de peito. Neste sentido, a estratégia de elevar o nível de Lys das rações pode alterar o equilíbrio metabólico ideal entre os aminoácidos, especialmente a relação Arg:Lys.

A Arg é considerado um aminoácido essencial para aves, sobretudo na fase inicial, pelo fato do ciclo bioquímico da uréia não ser funcional em aves, não podem sintetizar Arg e por isso são dependentes do fornecimento deste aminoácido nas dietas. Entre as espécies animais estudadas, as aves têm a mais alta exigência de Arg (Ball *et al.*, 2007), que se deve, além da falta de síntese endógena, a alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais linhagens de corte e o antagonismo com a Lys.

Além disso, o uso exclusivo de dietas a base de milho e farelo de soja representa fator particularmente sensível na disponibilidade de Arg para frangos de corte. Arg é o quinto aminoácido limitante nestas dietas, após metionina + cistina, Lys, treonina e triptofano (Atencio *et al.*, 2004).

A Arg, além de constituinte de proteínas, ainda está envolvida na síntese de creatina e poliaminas, de prolina, como substrato para a síntese do colágeno e de óxido nítrico (NO) e na secreção do hormônio do crescimento (GH) e dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF).

A biossíntese da creatina, que envolve também a participação da metionina, gera fosfocreatina, um componente essencial do metabolismo energético no músculo (Keshavarz & Fuller, 1971). As poliaminas são consideradas de importância nutricional no crescimento e desenvolvimento do intestino do neonato (Quinn *et al.*, 2002) e, essenciais na proliferação das células endoteliais, além de associadas à angiogênese e cicatrização de feridas (Hui *et al.*, 2002). A prolina, por ser o principal aminoácido na síntese do colágeno e gerador de matriz extracelular, tem importante função no remodelamento vascular.

O NO é um radical livre altamente reativo, permeável nas células e membranas que participa de vários processos celulares, incluindo a neurotransmissão o vasorrelaxamento dependente do endotélio e a imunidade. Altas concentrações de NO podem ser induzidas por uma variedade de estímulos inflamatórios como os lipopolissacarídeos de bactérias e citocinas (Hibbs Jr. *et al.*, 1988 e Marletta *et al.*, 1988 citados por Dusse *et al.*, 2003). O NO, ainda, exerce pronunciados efeitos sobre os mecanismos fisiológicos do tecido ósseo controlando o processo de remodelamento ósseo (Collin-Osdoby, 1995).

A síntese e secreção do GH são essenciais na promoção do crescimento, desenvolvimento e metabolismo de mamíferos e aves. Um dos efeitos mais conhecidos do GH ocorre em nível do disco epifisário, onde atua estimulando a síntese de IGF-I, que age paracrinamente, induzindo mitogênese, o que resulta no crescimento dos ossos longos (Isaksson *et al.*, 1987). O IGF-I também está envolvido em numerosos eventos anabólicos e catabólicos do músculo esquelético, como a agregação de proteína miofibrilar pela combinação dos efeitos sobre a síntese e a degradação protéica (Coleman *et al.*, 1995) e a diferenciação e proliferação das células satélite (Florini *et al.*, 1996), fundamentais no processo de hipertrofia muscular.

## 1.1. Metabolismo da Arg

A classificação dos animais, em amoniotélicos, ureotélicos e uricotélicos, baseia-se, exclusivamente, na predominância do metabolismo excretório de compostos nitrogenados. Mamíferos e aves apresentam metabolismo nitrogenado excretório distintos, sendo que as aves excretam o seu nitrogênio, preferencialmente, na forma de ácido úrico, enquanto os mamíferos o fazem na forma de uréia (Leningher, 2002).

A reconhecida inoperabilidade fisiológica do ciclo da uréia (Ciclo de Krebs-Hanseleit) em aves domésticas (Tamir & Ratner, 1963) é devido, em parte, pela ausência da enzima carbamil fosfatase sintetase que catalisa o primeiro passo do mecanismo de detoxificação da amônia que leva à síntese de uréia e Arg. Nas espécies uricotélicas, a enzima mitocondrial que desempenha uma função paralela é a glutamina sintetase, contudo, gera ao final do ciclo, apenas ácido úrico, cuja formação não é Arg dependente. Os átomos de C e de N que fazem parte da molécula de ácido úrico provêm do aspartato, do CO<sub>2</sub>, da glicina e da glutamina (Scott, 1983).

O primeiro passo, na síntese de Arg em mamíferos, é a formação do composto pirrolina-5-carboxilato (P-5-C) do glutamato e ou da prolina (Figura 1). A expressão de todas enzimas necessárias para a síntese da Arg, entretanto, é restrita ao fígado e à mucosa intestinal, onde a citrulina é formada pela ação da P-5-C sintetase e ornitina aminotransferase, que pode ser imediatamente convertida a Arg (Wu, 1997) ou liberada para a circulação. A citrulina é captada pelo rim e convertida em Arg e então fornecida para outros tecidos, via transportadores específicos.

Em decorrência desta dessemelhança metabólica, as aves são dependentes de uma fonte exógena de Arg, uma vez que este aminoácido não é obtido pela via de depuração nitrogenada utilizada pelas aves. Neste sentido, a Arg é considerada um aminoácido essencial para as aves.

Há mais de 60 anos, a essencialidade da Arg é reconhecida (Close *et al.*, 1938). Os primeiros trabalhos demonstraram que a Arg pode ser sintetizada a partir da citrulina, mas não da ornitina. Esta constatação explicou satisfatoriamente a clássica observação que citrulina, mas não ornitina, pode substituir Arg na dieta das aves, mas o mecanismo ainda permanecia desconhecido. Tamir & Ratner (1963) atribuíram à inabilidade das aves para sintetizar ornitina, citrulina e Arg à ausência de outra enzima chave do ciclo da uréia, a ornitina carbamiltransferase (Figura 2).

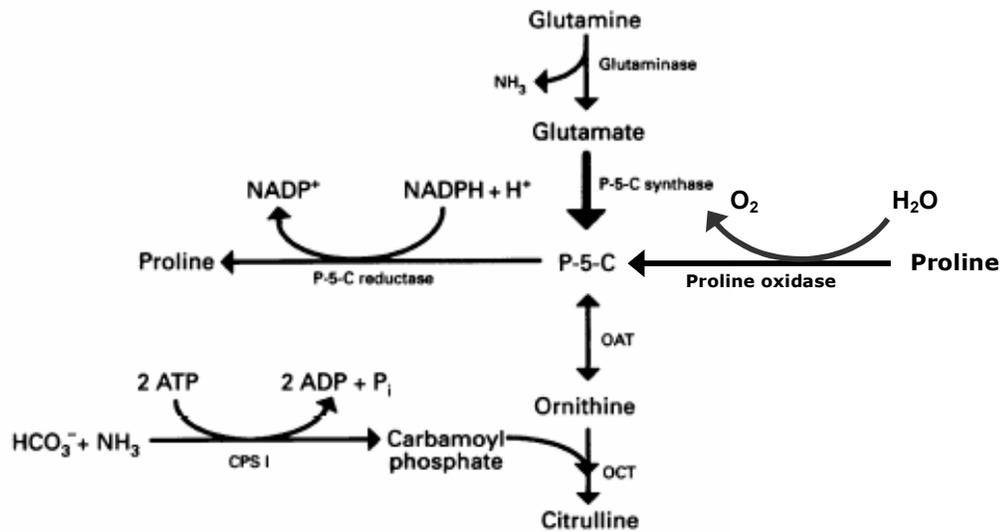


Figura 1. Síntese de citrulina e ornitina em mamíferos

Abreviaturas usadas: CPS I, carbamil fosfato sintetase; OCT, ornitina carbamiltransferase; OAT, ornitina aminotransferase; P-5-C, pirrolina-5-carboxilato.

Adaptado de Wu *et al.* (1995)

Em um estudo pioneiro com suínos e ratos, Windmueller, *et al.* (1981) e, posteriormente, Dhanakoti, *et al.* (1990) demonstraram que a síntese endógena renal de Arg depende da síntese intestinal de ornitina e citrulina. Wu *et al.* (1995) estudaram a expressão das enzimas envolvidas nos enterócitos das aves (P-5C sintetase, ornitina aminotransferase e ornitina carbamiltransferase), além da carbamil fosfatase sintetase que fornece o composto carbamil fosfato. Surpreendentemente, estes autores não encontraram nenhuma atividade da P-5-C sintetase, que converte glutamato em P-5-C e uma atividade muito baixa da ornitina aminotransferase, indicando pequena conversão de P-5-C em ornitina. A falta de conversão de glutamato em ornitina, e do composto intermediário P-5-C resulta também numa taxa muito baixa de conversão de ornitina em prolina, cerca de 4% da taxa de conversão observada em suínos. A P-5-C é um precursor comum da síntese do ornitina e da prolina (Figura 1) e, por isso, a prolina também é considerada um aminoácido essencial para as aves.

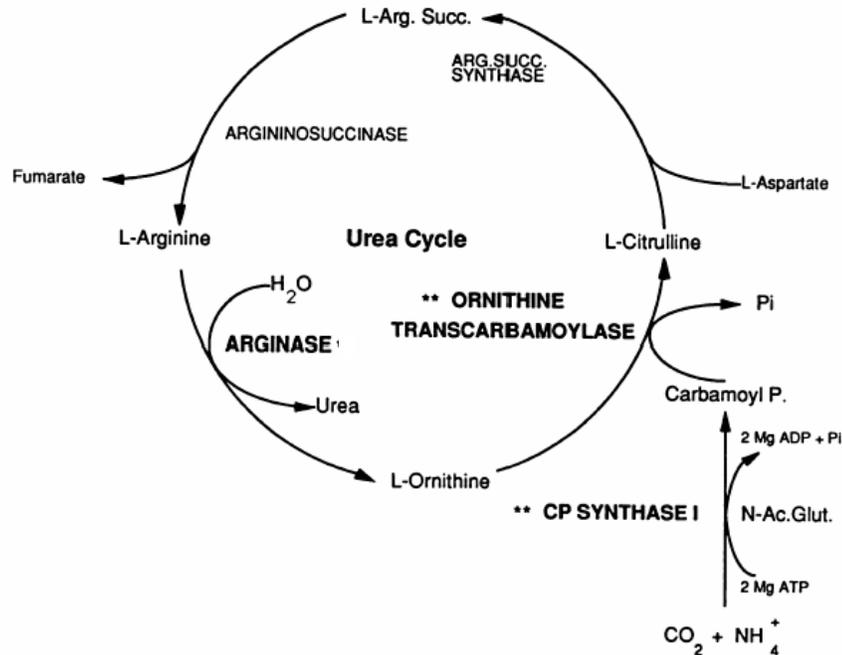


Figura 2. Ciclo da uréia em mamíferos.

Nas espécies uricotélicas, não há a formação de um ciclo completo pela falta das enzimas \*\*ornitina carbamiltransferase e\*\* carbamil fosfatase sintetase.

Adaptado de Sung *et al.* (1991)

Apesar da ausência do axis intestinal-renal para o fornecimento de citrulina para a síntese renal de Arg nas aves, alguns tecidos possuem capacidade de converter citrulina em Arg, sendo que o tecido renal é o maior sítio de conversão. As células endoteliais e os macrófagos e neutrófilos também podem reciclar Arg, a partir da citrulina produzida pelo óxido nítrico sintetase.

Wu & Morris (1998) descrevem a Arg como “um dos mais versáteis aminoácidos nas células animais”. De fato, a Arg é requerida para síntese de várias compostos tais como ornitina, poliaminas, prolina, creatina, síntese de proteínas, óxido nítrico (NO) e citrulina, além de glutamato e agmatina em mamíferos. A Arg é também considerada um potente secretagogo, aumentando a liberação na corrente sanguínea da insulina, hormônio do crescimento e IGF-I (Newsholme *et al.*, 2005), devido à rápida despolarização da membrana plasmática ligada ao transporte de aminoácidos com a cadeia lateral positiva (Figura 3).

Todas estas reações dependem da concentração intracelular de Arg e para isto duas vias podem ser descritas: 1) síntese de Arg a partir de outros substratos, no caso das espécies uricotélicas, citrulina, mecanismo pouco eficiente em condições de homeostase orgânica e ou; 2) transporte de Arg do meio extracelular para

compartimentos intracelulares, mecanismo que depende da disponibilidade de Arg dietética e da regulação da síntese de proteínas.

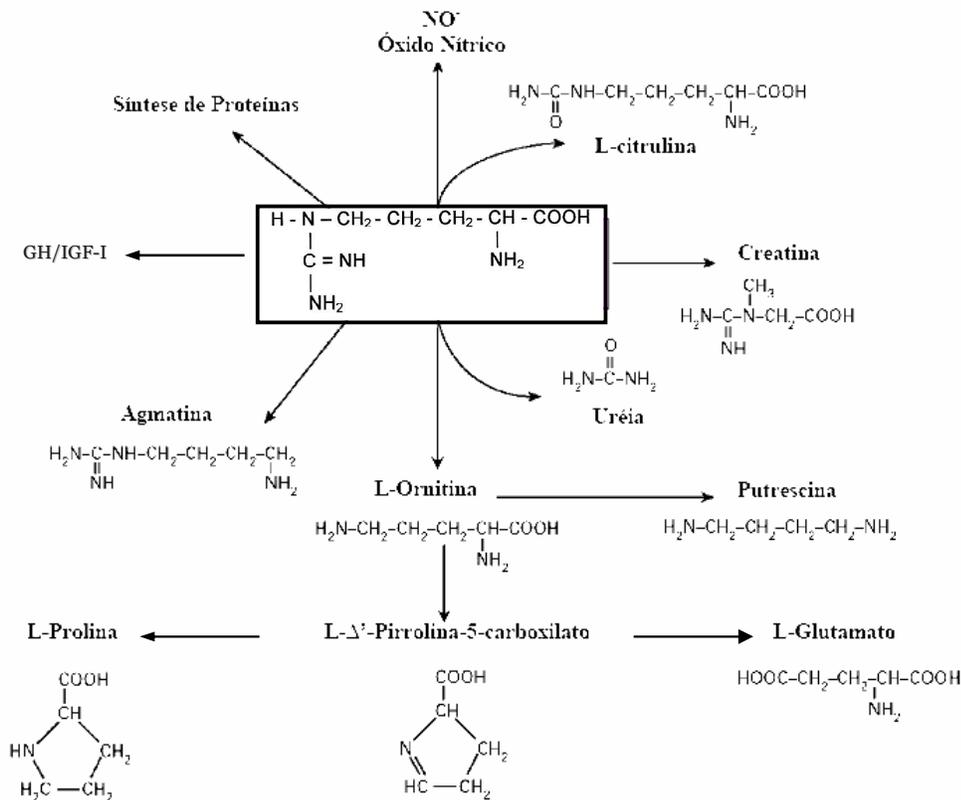


Figura 3. Principais vias de participação da Arg no metabolismo celular  
Adaptado de Wu & Morris (1998).

### 1.1.1. Arg e a síntese de creatina

A Arg é também catabolizada para a via biossintética da creatina. A Arg transfere um grupo guanidino para a glicina, pela ação da amidinotransferase formando ornitina e guanidinoacetato. Numa segunda reação, catalisada pela guanidinoacetato N-metiltransferase, a guanidinoacetato é metilada pela S-adenosilmetionina para formar S-adenosilhomocisteína e creatina (Bloch & Schoenheimer, 1941; Borsook & Dubnoff, 1945 citados por Gonzalez-Esquerria & Leeson, 2006). A creatina é liberada pelo fígado e captada, principalmente, pelo tecido

muscular onde é estocada como fosfocreatina ou convertida para creatinina e ambas as moléculas podem ser excretadas pelos rins (Figura 4).

Uma vantagem da síntese hepática de creatina para os mamíferos é que a ornitina, gerada nesta reação, pode ser reciclada a Arg, assim, este processo não seria “consumidor” de Arg (Brosnan & Brosnan, 2004). As aves, porém, não podem reciclar a Arg, via ornitina, uma vez que não possuem carbamil fosfatase sintetase e ornitina carbamiltransferase, enzimas necessárias para esta reação.

Em dietas exclusivamente vegetais, a exigência de Arg para a síntese de creatina é aumentada, uma vez que os vegetais não se constituem em fontes de creatina. Por outro lado, os subprodutos de origem animal são fontes ricas de creatina e dietas suplementadas com estes ingredientes podem ser consideradas “economizadoras” de Arg no metabolismo das espécies uricotélicas.

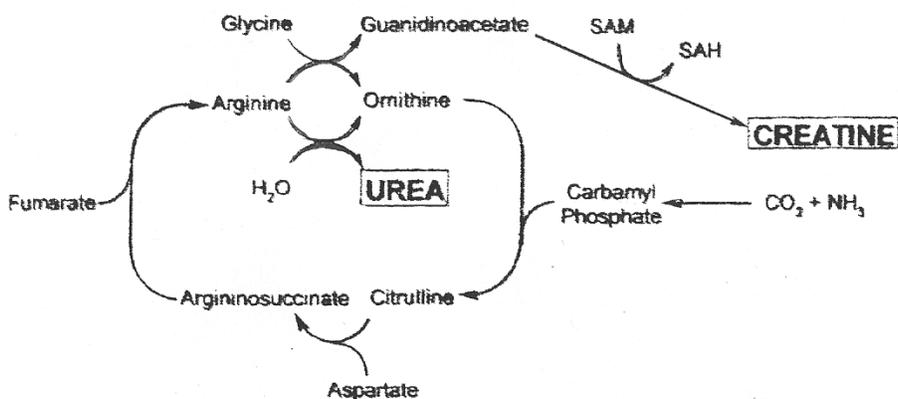


Figura 4. Via bi-cíclica proposta para a síntese de uréia e creatina no fígado de mamíferos  
Abreviaturas usadas: SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína.  
Adaptado de: Brosnan & Brosnan (2004).

### 1.1.2. Arg e a síntese de ornitina, poliaminas e prolina

Para que a Arg possa ser utilizada para a síntese das poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) ou prolina, precisa ser hidrolisada para uréia e ornitina pela arginase (Meijer, *et al.*, 1990; Wu & Morris, 1998). Como as aves não podem sintetizar ornitina, praticamente toda a ornitina plasmática é derivada do metabolismo da Arg (Nesheim, 1968; Austic & Nesheim, 1971; Stutz *et al.*, 1972; Chu & Nesheim, 1979). A uréia plasmática é associada com a suplementação de Arg, sendo que entre 40 a 60% da uréia, excretada pelas aves, é resultado da síntese de ornitina (Ruiz-Feria *et al.*, 2001).

Em mamíferos, são muito bem conhecidas duas formas distintas de arginase (arginase I e II), que são codificadas por diferentes genes e diferem nas propriedades moleculares e imunológicas, distribuição tecidual, localização intracelular e regulação da expressão (Wiesinger, 2001; Ash, 2004).

Arginase I, uma enzima citosólica encontrada no fígado, é um importante componente do ciclo da uréia, mas praticamente inexistente em outros tecidos, enquanto a expressão da arginase II, uma enzima mitocondrial, é conhecida em vários tecidos, como no rim, intestino delgado e cérebro (Brosnan & Brosnan, 2004). Essa compartimentação intracelular das arginases tem importantes implicações para o metabolismo das arginases nas células dos mamíferos. Devido à co-localização com a ornitina descarboxilase no citosol, a arginase I pode, preferencialmente, dirigir a ornitina para a síntese de poliaminas, enquanto a arginase II pode, da mesma forma, direcionar a ornitina para a produção de prolina e glutamato, já que ambas arginase II e ornitina aminotransferase, estão localizadas na mitocôndria (Figura 5).

Por outro lado, em espécies uricotélicas, esta enzima não é bem caracterizada. Grazi *et al.* (1975) descreveram a presença de duas arginases, hepática e renal, entretanto ambas estão localizadas na mitocôndria. Segundo estes autores, o ‘pool’ de Arg citoplasmática pode ser hidrolisado pela arginase mitocondrial, cuja expressão dessa enzima é detectada no lado externo da membrana e, por isso, pode agir sobre a Arg. Já, Bedford *et al.* (1987) encontraram uma relativa falta de atividade da arginase no fígado das aves indicando um mínimo potencial para a regulação da síntese de poliaminas neste tecido. Neste sentido, é possível atribuir à arginase renal o controle da síntese de poliaminas via degradação da Arg.

As aves têm a capacidade enzimática para a degradação da Arg por meio da atividade da arginase. Entretanto, ao contrário dos mamíferos, a atividade da arginase no rim, é 30 vezes maior do que no fígado. Apesar do fato de não haver um ciclo da uréia funcional nas aves, elas excretam uréia, que pode ser considerada “a medida da degradação da Arg por meio da arginase”. Em galinhas poedeiras, a atividade da arginase renal e a excreção de uréia foram aumentadas pela elevação da suplementação de Arg ou pelo aumento do consumo de ração.

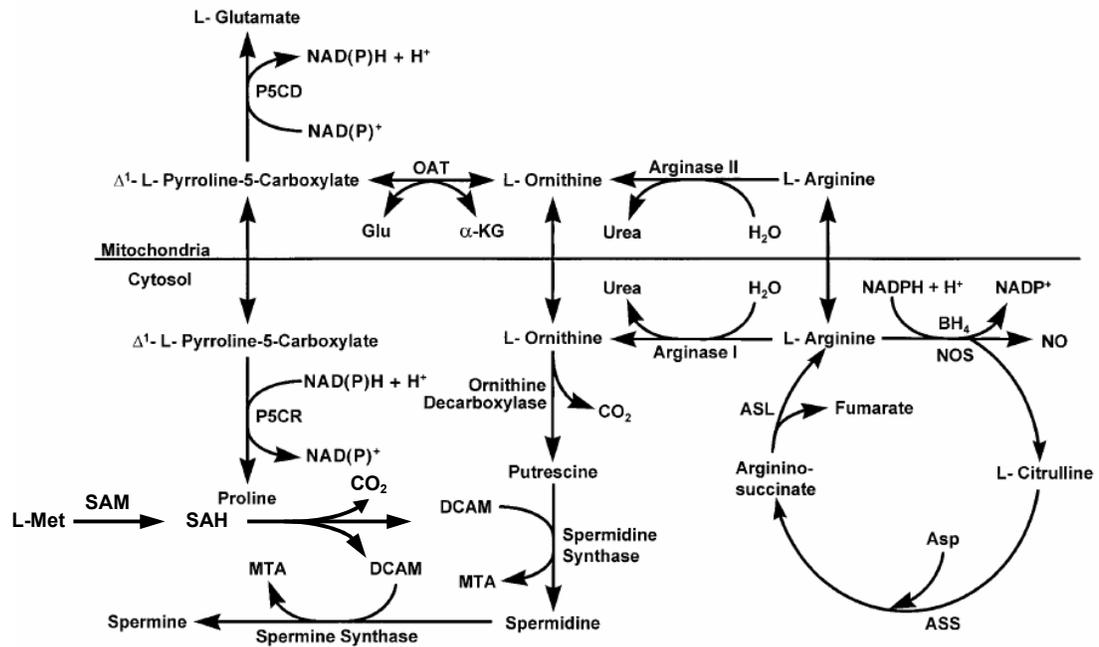


Figura 5. Metabolismo da Arg, ornitina e citrulina em células de mamíferos

Abreviaturas usadas: ASL, argininosuccinato liase; Asp, aspartato; ASS, argininosuccinato sintetase;  $\text{BH}_4$ , tetrahydrobiopterina; DCAM, S-adenosilmetionina descarboxilada; Glu, glutamato; MTA, metiltioadenosina; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintetase; OAT, ornitina aminotransferase; P5CD, pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; P5CR, pirrolina-5-carboxilato redutase;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetogluturato; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína.

Adaptado de Wu & Morris (1998).

Ruiz-Feria *et al.* (2001) referem-se apenas à arginase renal como de importância na degradação de Arg pelas aves e questionam que pode haver diferença entre linhagens de frangos de corte ou até dentro das linhagens com relação à atividade desta enzima. Sendo assim, as aves com elevada atividade enzimática poderiam degradar a Arg a taxas mais elevadas, favorecendo a síntese de poliaminas e prolina. No entanto, não é conhecido, se a exemplo do que descrito para mamíferos, existe uma via preferencial em relação ao direcionamento da ornitina para a síntese de prolina ou de poliaminas.

A putrescina é formada pela descarboxilação da ornitina e a espermina e a espermidina são obtidas da putrescina na presença da S-adenosilmetionina descarboxilada, derivada da metionina, existindo, então a participação de ambos os aminoácidos, Arg e metionina. Estas aminas biogênicas são importantes para a divisão celular, síntese protéica e crescimento tecidual (Seiler, 1992 citado por Gonzalez-Esquerre & Leeson, 2006).

As poliaminas, ainda, são consideradas de importância nutricional no crescimento e desenvolvimento do intestino do neonato (Quinn *et al.*, 2002). Além disso, as poliaminas, por serem essenciais na proliferação das células endoteliais, são associadas à angiogênese e à cicatrização de feridas (Hui *et al.*, 2002). Paralelamente, a

prolina, por ser o principal aminoácido na síntese do colágeno e gerador de matriz extracelular, tem importante função no remodelamento vascular.

Estudos da década de 70 mostraram que a taxa de conversão de Arg, em prolina, é menor do que 10% da exigência necessária para o crescimento normal das aves (Austic, 1973). Posteriormente, estes resultados foram confirmados por Wu *et al.* (1995) que demonstraram a ausência e ou a baixa atividade de enzimas-chave na obtenção de prolina pelas aves, reforçando a essencialidade da prolina, principalmente na sua fase inicial.

As concentrações teciduais de poliaminas, nas aves, parecem ser particularmente responsivas à manipulação dietética dos aminoácidos, possivelmente pela falta de um ciclo da uréia funcional (Smith, 1981). Bedford *et al.* (1987) observaram o aumento da atividade da arginase renal, seguido de aumento da disponibilidade de ornitina renal e elevação da putrescina, após alteração da relação Arg:Lys pelo aumento dos níveis de Lys. Por outro lado, elevadas concentrações de ornitina podem inibir a atividade da ornitina descarboxilase pela rápida formação e acúmulo da putrescina (Dircks *et al.*, 1986).

Essa elevação da atividade da arginase renal também é observada quando são fornecidos níveis muito altos de Arg (Stuz *et al.*, 1971). A degradação, excessivamente rápida de Arg, em ornitina e uréia, pode comprometer a síntese de NO, sendo esta a única via fisiológica de produção deste composto. Adicionalmente, a elevação da uréia plasmática, de acordo com Prabhakar *et al.*, (1997), pode inibir a ação da óxido nítrico sintetase (NOS), enzima que cataliza a reação que converte Arg em NO.

### 1.1.3. Arg e a síntese de óxido nítrico

A Arg é convertida à citrulina e NO de forma estequiométrica (1:1), por ação catalítica de um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintetases (NOS) (Förstermann *et al.*, 1991; Griffith & Stuehr, 1995), sendo esta a única via fisiológica de produção de NO.

Por outro lado, em espécies uricotélicas, esta reação é a única via de síntese endógena de Arg, pela ação catalítica da argininosuccinato liase e argininosuccinato sintetase sobre a citrulina. De acordo com Su & Austic (1999), macrófagos ativados podem reciclar até 20% da Arg derivada da citrulina.

O NO é um radical livre de natureza gasosa capaz de se difundir livremente por meio da membrana plasmática, é altamente reativo e é sintetizado e utilizado pelas células endoteliais, neurônios, macrófagos e outros tecidos, entre eles a hipófise (Marletta, 1993; Feelisch *et al.*, 1994; Hobbs & Ignarro, 1996). Muitos têm sido os papéis atribuídos ao NO e, muitas vezes esses papéis são controversos.

O surgimento do NO como um agente da sinalização celular é uma das mais importantes descobertas da fisiologia humana e animal nos últimos anos. O NO participa de vários fenômenos, como vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária. O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (Hibbs Jr. *et al.*, 1988 e Marletta *et al.*, 1988 citados por Dusse *et al.*, 2003).

Na literatura, são descritas três isoformas de NOS, sendo uma NOS induzida (iNOS ou NOS 2) e duas NOS constitutivas, endotelial e neuronal (cNOS ou eNOS 3 e nNOS 1). O NO é produzido pela eNOS 3 nas células endoteliais e funciona como vasodilatador, fator de angiogênese e fator de sobrevivência das células endoteliais (Hobbs & Ignarro, 1996; Dimmeler & Zeiher, 1999). Já, no Sistema Nervoso Central – SNC, o NO é produzido pela nNOS 1 neuronal, participando da neurotransmissão e no controle do fluxo sanguíneo cerebral (Brenman & Bredt, 1996). Ambas as formas são  $Ca^{2+}$ /calmodulina dependente (Adams, 1996) e são expressas continuamente na ausência de agentes indutores, com síntese basal em concentrações picomolares. A meia-vida do NO, no estado gasoso e dissolvido nos fluidos biológicos, é em média de 3 a 4 segundos e rapidamente é convertido em produtos estáveis da oxidação, nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) (Grisham *et al.*, 1999).

Ao contrário, a iNOS não depende de cálcio para ativação, mas a síntese de mRNA da iNOS é necessária para sua atividade. A NOS induzida não é detectável em condições basais. LPS ou endotoxinas bacterianas, junto com citocinas, como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  ou  $IF-\gamma$ , induzem a síntese de iNOS, de 2 a 4 h após a exposição ao agente. Como a iNOS requer síntese protéica para sua expressão e sua atividade persiste por mais de 24 h e sintetiza NO em concentrações nanomolares, 1.000 vezes maior que cNOS e, por isso, o NO é o elemento citotóxico-chave para eliminação de bactérias (Hibbs *et al.*, 1988; Marletta, 1993; MacMicking *et al.*, 1997).

A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa, resultante de uma infecção ou dano tecidual. Segundo Salvemini *et al.* (1996), o

NO é um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema por meio de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias.

A expressão da iNOS, em endotoxemia, é citoprotetória, inibindo microtrombose pela prevenção de adesão plaquetária e danos mediados por radicais. Por outro lado, a citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (Moncada *et al.*, 1991; James, 1995). Desta forma, são inativadas as enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular.

Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. O NO, por ser um radical livre, tem um de seus elétrons não emparelhados e, portanto, reage com moléculas com esta mesma característica. Um dos derivados mais reativos é o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que é formado pela reação entre o NO e o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que oxida proteínas, aminoácidos, lipídios e DNA, levando à injúria e morte celular (Li *et al.*, 2007).

Desta forma, a elevada concentração de NO, produzida pela iNOS, pode exercer efeitos deletérios sobre as células de mamíferos e mediar a patogênese de muitas doenças. Entretanto, Hartman *et al.* (2006) relatam que as células das aves são menos propensas aos efeitos nocivos do ataque destes radicais livres por terem altos níveis circulantes de ácido úrico.

O ácido úrico vem, recentemente, sendo considerado um importante antioxidante (Hare & Johnson, 2003) por eliminar radicais livres, quelar metais em transição e bloquear a ação dos peroxinitritos. Como as espécies uricotélicas não possuem a enzima urato oxidase que degrada o ácido úrico em alantoína, o ácido úrico pode atuar diretamente como antioxidante. A concentração plasmática de ácido úrico, em aves, é excepcionalmente alta quando comparada com outros vertebrados e, por isso, a ativação da iNOS que eleva os níveis de NO não teria as mesmas conseqüências relatadas para os mamíferos (Hartman *et al.*, 2006).

Outro aspecto a ser considerado, no metabolismo do NO, é a competição da arginase e a iNOS pela Arg como um substrato comum que pode levar à redução na síntese de NO pelos leucócitos. De acordo com Wu & Morris (1998), apesar da afinidade da iNOS pela Arg ser em torno de 1.000 vezes maior que a afinidade da arginase, a velocidade da reação da arginase sobre a Arg é cerca de 1.000 vezes maior que a da iNOS.

Nas aves, pouco tem sido elucidado a respeito desse mecanismo competitivo entre as enzimas. Por outro lado, Ash (2004) discute, no seu trabalho de revisão, um mecanismo inibitório recíproco entre a arginase I e a iNOS em mamíferos, prevenindo a produção de níveis demasiadamente elevados de NO e por outro lado, a inibição da atividade da arginase I resultaria na elevação da produção de NO. Desta forma, a arginase II atuaria produzindo ornitina para a síntese de poliaminas e prolina, necessárias para o reparo tecidual (Figura 6).

Esse mecanismo consensual é extremamente relevante para o funcionamento do sistema imune. A ativação da iNOS ou da arginase reflete o tipo de resposta inflamatória em uma enfermidade. Por exemplo, o processo infeccioso é associado com uma predominância da iNOS, com liberação do NO, uma substância microbicida e sinalizadora da imunidade celular, enquanto o trauma induz, preferencialmente, à arginase, que degrada Arg em poliaminas e prolina para o reparo tecidual e fibrose (Bronte & Zanovello, 2005).

Neste sentido, a suplementação adicional de Arg nas dietas de aves imunocomprometidas, poderia aumentar ainda mais a atividade da arginase, e com isso menos Arg seria disponível para a síntese de NO (Kepka-Lenhart *et al.* 2000). Alternativamente, Bansal *et al.* (2004) sugerem como estratégia dietética para restaurar as concentrações plasmáticas de Arg, a suplementação de citrulina, principalmente em condições de imunodeficiência associadas com elevada atividade plasmática da arginase. Nas espécies uricotélicas, o ciclo Arg-citrulina é funcional. A citrulina é um aminoácido que não é encontrado em nenhuma proteína corporal, além da inabilidade das aves na síntese endógena de citrulina, a suplementação dietética se constitui na única fonte de Arg para os macrófagos, via ciclo NO-citrulina (Wiesinger, 2001).

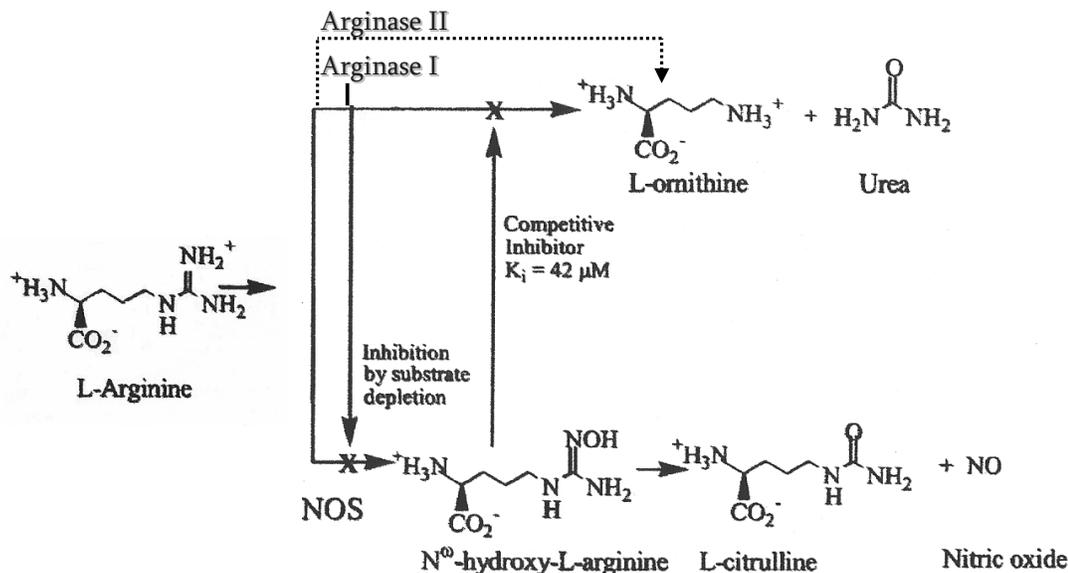


Figura 6. Relacionamento entre a atividade da arginase (I e II) e a atividade da NOS.  
Adaptado de Ash (2004)

## 1.2. Considerações sobre o Hormônio do Crescimento e a Relação com a Arg

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio protéico, constituído de 191 aa, com peso molecular ao redor de 22 kDa. As células especializadas em sintetizar, armazenar e liberar o GH são conhecidas como somatotrofos e estão localizadas, predominantemente, na porção lateral da hipófise anterior, compreendendo 40 a 50% de suas células (Brazeau *et al.*, 1973; Rens-Domiano & Reisine, 1992). A secreção do GH é pulsátil e regulada por um complexo sistema de controle neuroendócrino que, em linhas gerais, determina a secreção de dois hormônios hipofisiotrópicos, na eminência mediana do hipotálamo, que exercem efeitos de estimulação (o hormônio liberador do hormônio do crescimento-GHRH) e de inibição (somatostatina - hormônio inibidor da liberação do hormônio do crescimento-SRIH - GHRIH) sobre a liberação de GH.

Uma vez secretado da hipófise anterior para a circulação, o GH age diretamente no seu próprio receptor, e indiretamente, via IGF-I e II (insulin-like growth factor ou somatomedina C), sobre os tecidos periféricos. Um dos efeitos mais conhecidos do GH ocorre em nível do disco epifisário, em que atua estimulando a síntese de IGF-I, o qual atua paracrinamente, induzindo mitogênese, o que resulta no crescimento dos ossos longos (Isaksson *et al.*, 1987). O GH também atua estimulando a síntese de IGF-I pelo

figado, mecanismo pelo qual esse fator induz, entre outros efeitos, aquele descrito acima (Schwander *et al.*, 1983). Em síntese, o GH, via IGF-I, induz à síntese de proteínas por estimular a captação de aminoácidos e a transcrição e a tradução do mRNA de vários tecidos-alvo. Ele diminui o catabolismo de proteínas, por atuar diretamente na liberação de ácidos graxos do tecido adiposo, aumentando a sua conversão em acetil-CoA, fonte de energia para os tecidos periféricos. Esse efeito, associado ao estímulo da síntese protéica, é um importante mecanismo pelo qual o GH promove seus efeitos sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo.

Os fatores do crescimento semelhantes à insulina (IGF) são componentes de um sistema múltiplo que controla o crescimento e o metabolismo. Estes peptídeos receberam a denominação “semelhantes à insulina” pelo reconhecimento inicial da habilidade em estimular a captação de glicose pelos adipócitos e fibras musculares e a similaridade na composição da estrutura terciária, ambos, IGF-I e II, compartilham com a insulina 50% da cadeia de aminoácidos (Roith *et al.*, 2001).

Enquanto o IGF-II é essencial para o desenvolvimento embrionário, o IGF-I atua tanto no desenvolvimento pré e pós-natal (Fernández *et al.*, 2002). O nível plasmático de IGF-I é altamente influenciado pelo GH no crescimento pós-natal, enquanto o de IGF-II é pouco dependente.

Proporcionalmente, mais IGFs (I e II) estão presentes na forma livre no plasma de aves do que em mamíferos (McMurtry *et al.*, 1997). É sugerida a participação dos IGFs no estabelecimento da glicemia, já em situações de hiperglicemia como observadas após a alimentação, enquanto a insulina intervém normalizando os níveis glicêmicos (McMurtry, 1998). Valores normais de glicemia são encontrados na literatura variando de 248 a 320 mg/dL em aves (Belo *et al.*, 1976; Gonzáles *et al.*, 2001), enquanto para mamíferos são observados valores em torno de 90 a 150 mg/dL. Os valores de glicemia mais elevados em aves poderiam explicar esta diferença nos níveis plasmáticos dos IGFs.

A concentração plasmática de IGF-I apresenta um pico aos 15 dias de incubação (Kikuchi *et al.*, 1991) e tende a aumentar entre a primeira e sétima semanas após a eclosão, declinando de maneira linear após este período. Entretanto, alguns pesquisadores encontraram variações no relacionamento do IGF-I circulante e o desenvolvimento pós-natal em aves, e atribuem-nas à influência da seleção genética para altas taxas de crescimento em frangos de corte (Vasilatos-Youniken & Scanes, 1991; McMurtry, 1998; Duclos, 2005).

Por outro lado, McMurtry (1998) não encontraram relação dos níveis plasmáticos de IGF-II com a idade das aves. Ao contrário de mamíferos, em aves, IGF-II não se liga ao receptor tipo II; desta forma, é considerado que os efeitos do IGF, em aves, são mediados, exclusivamente, pelo receptor tipo I (Duclos *et al.*, 1991; Duclos, 2005).

De acordo com Roith *et al.*, (2001) o IGF-I é produzido localmente em diversos tecidos e a sua expressão pode ser regulada pelo GH. O IGF-I é conhecido por eliciar numerosos efeitos anabólicos no metabolismo do músculo esquelético, como a agregação de proteína miofibrilar pela combinação dos efeitos sobre a síntese e a degradação protéica (Coleman *et al.*, 1995, Florini *et al.*, 1996). O IGF-I, por meio de seu receptor, atua na formação, manutenção e regeneração do músculo esquelético (Tureckova *et al.*, 2001). Na placa de crescimento ósseo, o IGF-I estimula a proliferação e hipertrofia dos condrócitos, mecanismo responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos.

Os aminoácidos, além de serem biomoléculas constituintes de proteínas e peptídeos em todos os organismos vivos, são precursores de muitos compostos nitrogenados que possuem importantes funções fisiológicas.

A Arg participa como coadjuvante na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas (Bolea *et al.*, 1997) e na secreção do hormônio do crescimento (GH) (Ghigo *et al.*, 1994) sendo este último efeito, segundo revisão de Gomes Filho (1999), foco de atenção de vários grupos de pesquisa na atualidade.

Na década de 60, estudos já correlacionavam a ingestão de Arg com um aumento da secreção hipofisária do hormônio do crescimento (Merimee *et al.*, 1969).

Alba-Roth *et al.* (1988), estudando o papel da Arg sobre a secreção de GH em indivíduos normais, verificaram aumento da concentração plasmática desse hormônio quando esse aminoácido foi administrado. O efeito da Arg que induz à elevação de secreção de GH parece se dar no hipotálamo, por meio da inibição da liberação da somatostatina, por meio da ativação de vias colinérgicas (Ghigo *et al.*, 1990; Kelijman & Frohman, 1991). A consequência imediata desse efeito é o predomínio da secreção de GHRH pelo hipotálamo e a ativação do processo de secreção de GH, pela hipófise.

Outro fato bastante conhecido é que a Arg é transportada para dentro das células  $\beta$ -pancreáticas, e gera uma despolarização que provoca abertura de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), com entrada desse íon na célula (Bolea *et al.*, 1997; Hellman *et al.*, 1971) e, conseqüentemente,

liberação de insulina. Dessa maneira, não se pode descartar que a Arg possa atuar de maneira semelhante no somatotrofo, o que poderia induzir à secreção de GH.

Já, Valverde *et al.* (2001) demonstraram que a Arg estimula a secreção de GH por meio do NO, um neurotransmissor cerebral envolvido na regulação endócrina que, por meio de seus efeitos vasodilatadores, pode atuar indiretamente na liberação de hormônio hipofisários pela regulação do fluxo sanguíneo no sistema porta-hipofisário (Ceccatelli, 1997).

Entretanto, Kato (1992) relatou em seu estudo que a administração de altas doses de GHRH provoca ativação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e, conseqüentemente inibição da secreção de GH, sugerindo que o NO, quando em níveis supra-fisiológicos, inibe a secreção de GH. Outros estudos, ainda, têm demonstrado que o NO é quem estimula a liberação de somatostatina (Aguila, 1994).

O conjunto dos resultados apresentados quanto à participação do NO sobre o controle da secreção de GH e conseqüentemente dos IGFs, demonstra o quão controverso ainda é esse assunto, e que mais estudos devem ser conduzidos para maior esclarecimento de seu papel.

### **1.3. Considerações sobre a Ação Imunomodulatória da Arg como Precursor do Óxido Nítrico**

De acordo com Le Floch *et al.* (2004), duas rotas do metabolismo da Arg são identificadas e conhecidas por ter efeitos imunomodulatórios diretos. A primeira, na qual a Arg é convertida, a ornitina gera poliaminas, que têm papel-chave na divisão celular, síntese de DNA e regulação do ciclo celular. A segunda corresponde à síntese do NO, um radical livre altamente reativo, permeável nas células e membranas que participa de vários processos celulares, incluindo a neurotransmissão e a imunidade. Altas concentrações de NO podem ser induzidas por uma variedade de estímulos inflamatórios como os lipopolissacarídeos de bactérias e citocinas. Essa rota é essencial para a atividade citotóxica de macrófagos.

Todas estas investigações estabeleceram, de forma definitiva, uma associação entre Arg, óxido nítrico e resposta imune. Por isso, nas últimas duas décadas, a Arg tem sido o foco de estudos como um regulador de muitos processos imunológicos e fisiológicos (Tayade *et al.*, 2006).

Trabalhos desenvolvidos com mamíferos demonstram que as respostas imune podem ser influenciadas pela Arg dietética (Kennedy *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1998; Lewis & Langkamp-Henken, 2000). Experimentos desenvolvidos com animais jovens demonstraram efeitos timotróficos da suplementação com L-Arg, como o aumento do peso do timo, do número e a reatividade funcional dos linfócitos tímicos. Os efeitos imunoestimulatórios foram ainda mais expressivos em animais estressados ou imunossuprimidos.

Os efeitos benéficos da Arg não se limitam à imunidade celular. Segundo LeBien (2002), estudos com mamíferos geneticamente modificados demonstraram que a Arg é requerida para diferenciação de pró-linfócitos B para pré-linfócitos B, na medula óssea, e está envolvida na liberação destas células da medula.

Por outro lado, Deng *et al.* (2005) relatam que relevantes pesquisas em espécies aviárias são esparsas. Estas pesquisas apontaram o aumento da produção de NO por macrófagos de aves suplementadas com Arg (Sung *et al.*, 1991), aumento do peso dos órgãos linfóides (Kwak *et al.*, 1999), melhora da relação heterófilo:linfócito em pintos suplementados e desafiados com o agente viral da bronquite infecciosa e maior percentual de células CD8<sup>+</sup> (Lee *et al.*, 2002).

Entretanto, segundo Kidd (2004), os efeitos benéficos da suplementação de Arg foram observados quando os níveis empregados foram de 25 a 50% do requerimento estabelecido. Níveis próximos ao recomendado, apesar de elevar o nível de Arg plasmática, não melhoraram a resposta imune humoral ou celular.

Outros autores obtiveram respostas positivas com a suplementação de Arg, na redução na mortalidade de frangos desafiados com *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* e *Eimeria máxima*, alterando a relação Arg:Lys de 0,9 para 1,3 (Kidd *et al.*, 2001) e na síndrome da hipertensão pulmonar (Wideman *et al.*, 1995). Já, Kwak *et al.* (1999) observaram redução do peso dos órgãos linfóides e Qureshi *et al.* (2000) diminuição da função fagocítica dos monócitos e dos macrófagos durante o estresse por calor, quando utilizaram dietas com baixa relação Arg:Lys. Também, Corzo *et al.* (2003) observaram redução linear de arranhões infectados em carcaças de frangos alimentados com níveis crescentes de Arg (0,8 a 1,25% da dieta). Apesar de esses parâmetros serem índices indiretos da imunidade, os autores apontam a importância da Arg na melhora da imunidade e no restabelecimento do 'status' sanitário dos plantéis avícolas (Tayade *et al.*, 2006)

Entretanto, Deng *et al.* (2005) advertem que a suplementação com Arg, por um período curto de tempo, tem pouco efeito sobre a imunidade e que a imunocompetência

pode ser permanentemente moldada pelo ‘status’ nutricional nos estágios mais precoces do desenvolvimento.

A inadequada ingestão de Arg dietética prejudicou a síntese de NO por ambas as enzimas, cNOS e iNOS em ratos (Wu *et al.* 1999) e reduziu a resposta imune em frangos de corte na fase de crescimento (Konashi *et al.* 2000).

Durante a resposta imune mediada por células, a maioria das células adquire a capacidade de expressar a forma de NO induzida (Nathan & Xie, 1994). A ação do NO depende da célula T reconhecer um antígeno específico, embora sua ação na resposta imune mediada por células não seja específica (Schmidt & Walter, 1994).

Nos mamíferos, a homeostase da Arg plasmática é influenciada pelo ciclo da uréia e conseqüentemente,, não apenas pela Arg dietética, mas do ‘status’ do metabolismo nitrogenado. Por outro lado, aves dependem basicamente da Arg dietética e em função dessa relação direta entre a suplementação dietética de Arg e a quantidade de Arg disponível para o metabolismo, as aves podem ser modelo valioso para estudar os efeitos da Arg na resposta imune (Sung *et al.*, 1991).

Resultados obtidos de estudos com diferentes espécies animais indicam que o adequado fornecimento de Arg dietética é requerido para o desenvolvimento dos linfócitos e na melhora da função imune em vários modelos de desafios imunológicos (Field *et al.* 2000; Li *et al.*, 2007). Em ratos, uma deficiência de Arg induzida, por uma elevação da atividade da arginase intestinal, prejudicou o desenvolvimento das células progenitoras de linfócitos B na medula óssea, e diminuiu o número de linfócitos B em órgãos linfóides secundários (De Jonge *et al.*, 2002), condição revertida com a administração subcutânea de Arg.

#### **1.4. Crescimento e Desenvolvimento do Músculo-Esquelético dos Frangos de Corte**

O crescimento animal está na dependência de mecanismos de expressão gênica, e por meio deles ocorre a síntese de proteínas que são fundamentais para o desenvolvimento de diferentes tecidos. A síntese de proteínas, por outro lado, depende da disponibilidade de substratos, pois a interação entre nutrientes e expressão gênica determinará o padrão de crescimento do frango (Gonzales & Sartori, 2002).

A partição de nutrientes para o crescimento específico de cada tecido é modulada, prioritariamente, pela ação de vários hormônios e seus receptores que, por sua vez, atuam sobre a síntese de enzimas reguladoras dos processos anabólicos e catabólicos do tecido (Cogburn *et al.*, 2000).

Níveis de nutrientes acima da exigência, para maximizar ganho de peso ou conversão alimentar, podem resultar em melhor rendimento da carcaça, expresso pela redução da gordura ou maior acréscimo de carne de peito, ou em melhora do ‘status’ imunológico da ave (Waldrup, 2002). Uma vez que a maior quantidade de proteína no corpo do animal é observada nos músculos; o crescimento depende, particularmente, do desenvolvimento muscular.

Entretanto, em frangos de corte modernos selecionados para altas taxas de crescimento, o desenvolvimento e a maturidade óssea não acompanham o ritmo do crescimento muscular, em conseqüência, é observado dificuldade locomotora que contribui para a redução do crescimento, aumento da taxa de mortalidade e piores índices de eficiência econômica da produção comercial (Rath *et al.*, 2000).

A base do mecanismo ainda não é totalmente esclarecida. Parte destes problemas pode ser pela excepcional conformação do músculo peitoral das modernas linhagens. Estas aves têm, normalmente, pernas curtas com uma grande quantidade de massa muscular, com isso o peso do peito move o centro de gravidade cranialmente (Corr *et al.*, 2003). Para compensar estas variações, andam lentamente com os dedos dos pés apontados para fora e param constantemente, tornando-se cada vez menos ativos (Kestin *et al.*, 2001).

O estímulo mecânico juntamente com o genótipo e alterações nos constituintes da dieta podem interromper os eventos envolvidos no processo de condrogênese e osteogênese e desencadear o processo de formação das lesões no tecido ósseo. Estas lesões levam à dificuldade locomotora, predispõem às infecções ósseas e à deformação óssea como curvatura da porção proximal da tíbia, fratura das fíbulas e defeitos de angulação da articulação intertarsal (Emmerson, *et al.*, 1991; Nelson, *et al.*, 1992; Oviedo & Ferket, 2005).

Além das perdas econômicas decorrentes, é clara a percepção que as disfunções do aparelho locomotor comprometem o bem-estar das aves.

### 1.4.1. Desenvolvimento da fibra muscular esquelética

A unidade de organização histológica do músculo esquelético é a fibra muscular, uma célula larga, cilíndrica e multinucleada. O diâmetro das fibras pode variar entre 10 e 100µm, consoante a espécie e o músculo particular examinado, podendo mesmo apresentar variações consideráveis dentro do mesmo músculo. A maior parte do citoplasma celular da fibra muscular está ocupada por miofibrilas de 1 a 2µm de diâmetro.

Segundo Dubowitz & Brooke (1984), três tipos de fibras podem ser identificadas nas musculaturas das aves, demonstradas por técnicas histoquímicas, tipo I - contração lenta e oxidativa; tipo IIA – contração rápida e oxidativa e glicolítica; e tipo IIB – contração rápida e glicolítica, as quais correspondem às fibras SO (*Slow Oxidative*), FOG (*Fast Oxidative Glycolytic*) e FG (*Fast Glycolytic*), respectivamente, pela nomenclatura de Peter *et al.* (1972).

As fibras do tipo I são pequenas e têm numerosas mitocôndrias e o pigmento mioglobina em abundância, o que lhes confere a cor vermelha. As fibras do tipo II são células musculares grandes que possuem pequena quantidade de mioglobina e de mitocôndrias. As fibras do tipo IIA são resistentes à fadiga, enquanto as fibras IIB são facilmente fatigáveis, com grande acúmulo de ácido láctico.

As fibras aeróbicas, por estarem associadas ao processo contínuo de produção e consumo de energia, têm elevadas trocas de metabólitos e oxigênio, tendo pequena área. Já, as fibras anaeróbicas, com reduzida taxa de trocas metabólicas e de oxigênio, apresentam maior área e, portanto, maior processo de hipertrofia (Banks, 1992).

O fenótipo definitivo de fibras musculares esqueléticas adultas é resultado de eventos que começam no embrião e são modulados no decorrer da vida do organismo. Portanto, a formação das fibras musculares esqueléticas está essencialmente completa na eclosão, sendo, incapazes de sofrerem mitoses nos músculos adultos (Sartori *et al.*, 2003). O aumento do tamanho das fibras, envolvendo aumento em comprimento dos filamentos, aumento do número de miofibrilas por fibra e aumento do diâmetro médio das fibras, é um processo dependente da agregação de novos núcleos às fibras musculares.

O tamanho do músculo pode ser permanentemente reduzido se houver inibição da agregação de novos núcleos durante o desenvolvimento muscular inicial. Halevy *et*

*al.* (2000) submetaram pintinhos a diferentes períodos de jejum na primeira semana e observaram perdas permanentes no rendimento de peito aos 41 dias de idade. Observaram, ainda, que a síntese de DNA muscular e o número de células por grama de tecido em animais que não sofreram restrição tiveram um pico entre os segundo e terceiro dias após a eclosão, declinando posteriormente.

Este processo hipertrófico mediante o aumento do conteúdo de DNA das fibras musculares observado no crescimento pós-eclosão é atribuído à atividade das células-satélite (Moss, 1968). As células satélite estão localizadas entre a lâmina basal e o plasmalema e têm a potencialidade de se multiplicar e fundir com as fibras adjacentes, fornecendo mionúcleos com maior capacidade para a síntese da proteína.

Essas células estão presentes em grande número e são muito ativas logo após a eclosão, tendo seu número reduzido de forma acentuada com o crescimento. Em embriões, as células satélite correspondem a 30% das células presentes no músculo esquelético, enquanto que em adultos são menos de 5% (Pavlath, 1996 citado por Hawke & Garry, 2001). Ainda, segundo Moore *et al.* (2005), a atividade mitótica dessas células, aos 7 dias de idade, é reduzida em torno de três vezes quando comparada ao primeiro dia de vida. Logo após o período de desenvolvimento inicial, estas células tornam-se quiescentes sendo ativadas apenas em condições de estresse, tais como a injúria muscular. Assim, a alteração nas taxas de atividade mitótica das células satélite tende a ser uma explicação para o aumento do número de núcleos da fibra muscular à medida que as aves crescem. Moss & Lebblood (1971) concluíram que a atividade mitótica das células satélite responde por todos os núcleos incorporados em fibras musculares normais após o nascimento e este fenômeno representa mais de 98% do conteúdo de DNA final do músculo (Moss, 1968; Duclos, 2005).

De acordo com Hawke & Garry (2001), devido a sua capacidade proliferativa e por serem consideradas células progenitoras, as células satélite são importantes na hipertrofia e regeneração do músculo esquelético.

O IGF-I é um potente mitogênico, que pode ser produzido localmente durante a hipertrofia muscular e pode induzir a proliferação das células satélite. Segundo Machida & Booth (2004), o IGF-I pode estimular e ou coordenar os processos metabólicos necessários, tanto para aumentar a proteína muscular (Duclos *et al.*, 1991), quanto para recrutar as células satélite (Florini *et al.*, 1996). Assim, novos núcleos são incorporados e é mantido o equilíbrio entre o número de mionúcleos e o tamanho das fibras musculares.

Os autores, ainda, concluíram que o IGF-I estimula o crescimento pós-natal do tecido muscular esquelético de forma autócrina e parácrina. Entretanto, dados recentes mostram que a ação parácrina do IGF-I pode ser mais importante para o crescimento muscular que a endócrina ou circulante (Guernec *et al.*, 2004).

Adams & Mccue (1998) relataram que a infusão localizada de IGF-I, no músculo esquelético de ratos 'in vivo', resultou em hipertrofia e que a relação DNA:proteína do músculo hipertrofiado aumentou. Estes resultados indicam que houve a incorporação de células satélite, cuja proliferação foi induzida pelo IGF-I.

Segundo Baron-Davis *et al.* (1999), as células satélite exercem papel fundamental na mediação dos efeitos parácrinos/autócrinos do IGF-1 nas miofibrilas do tecido esquelético de ratos. Os autores usaram radiação gama para destruir a capacidade proliferativa das células satélite do músculo extensor *digitorium longus*. Após quatro meses, os ratos tratados apresentaram redução significativa do crescimento normal do músculo quando comparado com ratos que não receberam o tratamento. Os dados encontrados demonstram que o mecanismo pelo qual o IGF-I induz a hipertrofia muscular pode ser uma combinação via células satélite e aumento da síntese protéica, o que é confirmado na revisão de Duclos (2005).

De acordo com Gonzales & Sartori (2002), o crescimento alométrico do tecido muscular dos frangos de corte descreve uma trajetória marcadamente expressiva na fase inicial do desenvolvimento. Desta forma, parece evidente a importância de se determinar os níveis adequados dos aminoácidos requeridos para otimizar o desenvolvimento do tecido muscular nessa fase.

Uma preocupação especial existe quanto à Lys, já que este aminoácido apresenta-se em grandes quantidades nos músculos, sendo um dos principais constituintes das proteínas musculares. Por outro lado, na literatura, são encontrados relatos, atribuindo à Arg, o papel de coadjuvante na secreção do hormônio do crescimento (GH) (Gomes Filho, 1999), não obstante a relação antagonista conhecida entre estes dois aminoácidos.

Considerando que "carne" corresponde à musculatura esquelética, os estudos do crescimento das aves devem avaliar as mudanças nos músculos e as influências no seu uso como carne, de modo que técnicas que aumentam o crescimento muscular possam ser identificadas (Sams, 1999).

### 1.4.2. Desenvolvimento e metabolismo do tecido ósseo

O tecido ósseo compõe um sistema de suporte e proteção, além de representar a maior fonte de íons inorgânicos, participando ativamente na homeostase do cálcio no organismo (Marks Jr. & Odgren, 2002).

O osso é um tecido altamente especializado, composto por células (2%) incrustadas em uma matriz orgânica que é enrijecida por depósitos de sais de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita e representa cerca de 60 a 70% do peso do osso. Esta matriz é constituída por colágeno (80 a 90%), que na sua forma madura é composta pelas *cross-linking* das fibrilas de colágeno (hidroxilil piridinolina e lisil piridinolina), por proteoglicanas, lipídios e proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteonectina e osteopontina) que representam 10 a 15% da matriz orgânica. As proteínas não colagenosas estão associadas à estabilização da matriz, à calcificação, e outras atividades regulatórias metabólicas. A matriz mineral inorgânica representa a rigidez (força de ruptura) e resistência à compressão, enquanto que as fibrilas orgânicas do colágeno suportam a tensão e a torção (Oviedo & Ferket, 2005).

Nos vertebrados superiores, o processo de ossificação endocondral é o responsável pelo crescimento longitudinal da maioria dos ossos do esqueleto. Em circunstâncias normais, a calcificação ocorre no disco epifisário pela ação de células conhecidas como condrócitos, que obedecem aos estágios de proliferação, hipertrofia e calcificação (Leach & Gay, 1987).

Esta divisão, em zonas distintas, é definida por uma terminologia que implica em discreta arquitetura funcional e estrutural, em que uma transição gradual entre os componentes é observada. Os condrócitos dentro de cada região possuem variada morfologia celular, bem como atividade bioquímica, incluindo a secreção de vários componentes da matriz extracelular e atividade enzimática (Anderson, 1995; Gerber & Ferrara, 2000).

A invasão vascular é um ponto crítico na substituição do modelo cartilaginoso pelo tecido ósseo, que além de agir como condutor de células como monócitos, macrófagos, condroclastos e células osteoprogenitoras, também carrega oxigênio que é essencial para o tecido ósseo (Pines & Hurwitz, 1991). Cálcio e fósforo e por último hidroxiapatita são depositados no fluido extracelular. A taxa de mineralização depende

das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_3^{-4}$  no fluido extracelular, pH e a concentração de proteoglicanas.

Qualquer deficiência no crescimento ósseo e ou na homeostase pode culminar em desordens esqueléticas, como a discondroplasia tibial (DT), uma desordem bem reconhecida em frangos de crescimento rápido, primeiramente descrita por Leach & Nesheim (1965). É atribuída a uma assincronia no processo de diferenciação dos condrócitos, levando à formação de uma camada de condrócitos pré-hipertróficos não calcificada e resistente à invasão vascular (Rath *et al.*, 1998; Edwards Jr., 2000; Praul *et al.*, 2000). Como os condrócitos continuam a proliferar-se normalmente, ocorre acúmulo de condrócitos pré-hipertróficos e a lesão aumenta em tamanho (Rath *et al.*, 1998; Reddi, 2000).

Nessas condições, o fornecimento de nutrientes e de oxigênio aos condrócitos localizados no interior da lesão é inadequado, o que resultaria em maior morte celular por apoptose (Praul *et al.*, 2000).

A incidência de DT pode atingir mais de 30% dos lotes de frangos de corte e perus. Na maioria dos casos, a lesão é subclínica (Whitehead, 1992).

O pico de ocorrência da doença em frangos de corte é em torno das quatro-sete semanas, concomitante ao período de taxa máxima de crescimento. Entretanto, os desarranjos metabólicos na placa de crescimento são coincidentes com o período de formação óssea, entre 4 a 18 dias (Williams *et al.*, 2000). As lesões secundárias, associadas com a discondroplasia, levam à dificuldade locomotora, predispõem às infecções e às deformações ósseas da porção proximal da tíbia, do tipo ‘valgus’ e ‘varus’, bem como à diminuição da resistência óssea por uma porosidade excessiva do osso (Thorp, 1994; Oviedo & Ferket, 2005) e susceptibilidade a futuras fraturas.

De acordo com o Departamento de Inspeção Final (DIF) de um abatedouro de aves, cerca de 6,40% de carcaças de frango de corte são condenadas por lesões extensas, nas asas ou coxas provocadas por abscessos, contusões/fraturas e artrites (Assis *et al.*, 2003).

Pizauro Jr *et al.* (2002), em um trabalho de revisão, consideram que a ocorrência de DT pode estar relacionada com fatores que regulam a diferenciação dos condrócitos.

Hukkanem *et al.* (1999) já haviam sugerido que o NO pode participar da regulação do ‘turnover’ de condrócitos da placa de crescimento. Os autores demonstraram a expressão do mRNA da cNOS basal (óxido nítrico sintetase endotelial) em condrócitos hipertróficos de placas de crescimento de ratos neonatos.

Na placa de crescimento, o NO poderia facilitar a vascularização e a formação óssea (Rath *et al.*, 2000), a exemplo de sua ação na cartilagem articular, onde induz respostas biológicas que levam à degradação irreversível (Pelletier *et al.* (1998). Segundo Amin & Abramson (1998) o NO induz à apoptose dos condrócitos nas osteoartrites.

Pelo grande número de moléculas e, conseqüentemente, processos que o NO pode modificar, seu efeito nas células é complexo e pode ser tanto deletério quanto citoprotetor. Neste sentido, Van't & Ralston (2001), em artigo de revisão, advertem que o efeito do NO, na atividade dos osteoblastos, pode ser bifásico. O NO, em altas concentrações, tais como aquelas observadas após estimulação das citocinas inflamatórias, em que a iNOS, é a isoforma envolvida, têm efeito inibitório no crescimento e diferenciação osteoblástica. A combinação deste com espécies reativas de oxigênio produzem efeitos deletérios como processos degenerativos, isquemia, inflamação ou morte celular (Estrada & Murillo-Carretero, 2005). Um dos derivados mais reativos é o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que é formado pela reação entre o NO e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), considerado um dos principais efetores de morte celular induzida por NO (Li *et al.*, 2007).

É conhecido que a Arg é precursora do NO (Palmer *et al.*, 1988), mas é também bem documentada a relação antagônica entre Arg e Lys (Austic & Scott, 1975). O aumento, na concentração de Lys nas dietas, favorece a síntese protéica levando a maior rendimento de peito (Acar *et al.*, 1991), entretanto é preciso considerar o efeito sobre o desenvolvimento ósseo.

As deformações ósseas podem estar também relacionadas com a porção orgânica do osso e não com a porção mineral (Elkin *et al.*, 1978; Moraes *et al.*, 1984, Silva *et al.*, 2001). Segundo conclusão de um trabalho de Sekine *et al.* (1994), os aminoácidos agem sobre o crescimento transversal do osso e que essa ação facilita a formação da matriz e a calcificação óssea.

Um dos primeiros estudos que confirmaram o envolvimento da deficiência de Arg, no desenvolvimento de problemas locomotores em frangos, foi conduzido por Newberne *et al.* (1960), que descreveram atraso no desenvolvimento ósseo tibiotarso de frangos de corte. Entretanto, em várias publicações a respeito das disfunções locomotoras de frangos de corte, poucas inferências são feitas em relação à participação da relação Arg:Lys (Pierson & Hester, 1982; Leeson & Summers, 1988; Edwards Jr., 1992, Whitehead, 1992, Thorp, 1994).

Yun *et al.* (1991) relataram redução no comprimento dos ossos em aves alimentadas com dietas deficientes em Lys (0,6%). Sekine *et al.* (1996) observaram redução do ganho de peso e problemas de pernas em frangos de corte, quando a dieta continha 1,6% de Lys digestível, entretanto com a suplementação de 2,0% de Arg, os problemas de pernas foram amenizados ou desapareceram. Gadelha (2004) descreveu o aumento na incidência de problemas de pernas nos frangos de corte, à medida que aumentou o nível de Lys na ração. Entretanto, da mesma forma que já descrito na literatura, com a adição de níveis crescentes de Arg, houve redução do problema.

A literatura, ainda, cita que altos níveis do íon cloreto podem exacerbar o antagonismo entre Arg e Lys. Em dietas convencionais, mas com níveis elevados de cloretos, pode ser induzida uma deficiência de Arg (Calvert & Austic, 1981; Gonzales & Macari, 2000; Leeson & Summers, 2001). Murakami *et al.* (2001), estudando as exigências nutricionais dos íons sódio e cloreto para frangos de corte, observaram que a área da zona hipertrófica aumentou com a concentração do íon cloreto, sugerindo que altos níveis de cloreto podem aumentar a probabilidade de incidência de DT.

Segundo Baylink *et al.* (1993), os efeitos dos aminoácidos essenciais, no tecido ósseo em crescimento, são, provavelmente, mediados pelo IGF-I, que estimula à proliferação e diferenciação osteoblástica, à síntese do colágeno tipo I, a produção de osteocalcina e a atividade da fosfatase alcalina. Além disso, o IGF-I é considerado importante fator para o crescimento longitudinal do osso (Froesch *et al.*, 1985).

De acordo com revisão de Isaksson *et al.* (1987), o GH age diretamente na zona germinativa da placa de crescimento, aumentando a diferenciação e a proliferação das células progenitoras dos condrócitos enquanto o IGF-I é requerido no desenvolvimento final dos condrócitos (Roith *et al.*, 2001).

Chevalley *et al.* (1998) demonstraram que Arg e Lys aumentaram a produção 'in vitro' de IGF-I por osteoblastos mantidos em cultura. Este efeito pode estar relacionado às características físico-químicas da cadeia lateral dos aminoácidos básicos, como a Arg e a Lys. Pela despolarização da membrana ligada ao transporte de aminoácidos carregados positivamente, estes são potentes secretagogos para a insulina, GH e IGF-I (Newsholme *et al.* 2005).

Conconi *et al.* (2001) encontraram níveis significativamente aumentados de fosfatase alcalina e síntese de colágeno, trabalhando com cultura de osteoblastos enriquecidos com solução de aminoácidos essenciais (Arg, Lis, Met, Thr e Trp). Estes resultados, segundo os autores, sugerem que os aminoácidos podem atuar diretamente

na formação da matriz óssea e podem também modular o crescimento e a diferenciação de osteoblastos.

### **1.5. Interação Metabólica entre Lys e Arg no Desempenho Produtivo e no Rendimento e Qualidade da Carcaça de Frangos de Corte**

Lys é um aminoácido dietético indispensável para todas espécies animais já estudadas (Ball *et al.*, 2007). É o aminoácido dietético mais limitante para a síntese de proteína corporal, o que explica a vasta literatura disponível a respeito do requerimento de Lys em diferentes espécies quando comparada com outros aminoácidos. A essencialidade da Arg, por outro lado, está condicionada à espécie animal e dentro da espécie, à condição fisiológica, pela variável capacidade de síntese endógena.

A exigência de Lys, em qualquer espécie animal, é influenciada primeiramente pela exigência para a síntese protéica e para a síntese de carnitina, enquanto a exigência de Arg é influenciada por muitos fatores. Além da síntese protéica, inclui a síntese ‘de novo’, participação do processo de depuração nitrogenada pelo do ciclo da uréia nas espécies ureotélicas e a síntese de compostos não protéicos como a creatina, óxido nítrico, poliaminas, prolina e uréia.

Deste modo, a exigência de Arg, para as aves, é resultante do requerimento metabólico para a síntese protéica, síntese de metabólicos e para repor a Arg que é degradada pela arginase renal, em conseqüência, é o mais alto requerimento entre as espécies animais estudadas, apesar das aves não necessitarem de Arg para o ciclo da uréia (Ball *et al.*, 2007). A explicação para esse alto requerimento de Arg é a falta de síntese endógena, alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais linhagens de corte, além da interação metabólica entre Lys e Arg devido à relação antagônica (Edmonds *et al.*, 1987).

Estas diferenças metabólicas entre Lys e Arg são relevantes na compreensão do mecanismo antagônico entre estes aminoácidos, em que o consumo de níveis elevados de Lys afeta adversamente o metabolismo da Arg, aumentando sua exigência.

O efeito negativo do antagonismo entre Lys e Arg, no ganho de peso, não se deve apenas à redução do consumo alimentar, como observado quando há um desequilíbrio entre aminoácidos, mas por outros efeitos sobre o metabolismo e a utilização da Arg (Harper *et al.*, 1970). Conseqüentemente, há exigência metabólica, mas não

necessariamente dietética de Arg nesta situação. Isto é, particularmente, importante no que diz respeito à variação da exigência de Arg e do efeito negativo do antagonismo em pintinhos e aves adultas (Ball *et al.*, 2007).

Das espécies estudadas, apenas aves, cães e ratos apresentam relação antagônica evidente entre Lys e Arg. Entretanto, o exato mecanismo não foi ainda totalmente elucidado em nenhuma destas espécies. Ambos os aminoácidos compartilham e competem por transportadores intestinais e renais, entretanto, não há evidências que comprovem que o antagonismo é devido a esta competição (Kadirvel *et al.*, 1974; Czarnecki *et al.*, 1985). Em aves, particularmente, a atividade da arginase renal é marcadamente aumentada pelo excesso de Lys na dieta (Jones *et al.*, 1967), o que poderia causar elevado catabolismo da Arg e, assim, explicar o antagonismo observado nos pintinhos. Entretanto, a elevação da atividade da arginase renal não é a única causa do antagonismo, porque o aumento plasmático desta enzima não é detectado antes de 2 a 4 dias após a ingestão de uma dieta rica em Lys, apesar da diminuição significativa do nível plasmático de Arg dentro de 6 h, após a administração da dieta (Ball *et al.*, 2007).

O quadro antagônico, entre estes dois aminoácidos, parece ser multifacetado. Segundo Balnave & Brake (2002), altas concentrações de cátions, como o potássio, em dietas contendo excesso de Lys amenizam o efeito negativo do antagonismo sobre o desempenho dos animais. O potássio estimula a Lys- $\alpha$ -cetoglutarato redutase, uma enzima envolvida no catabolismo da Lys. Por outro lado, a elevação dos níveis de cloreto atua no catabolismo da Arg. Em dietas convencionais, mas com níveis elevados de cloretos, pode ser induzida a deficiência de Arg.

O excesso de Lys interfere também com a atividade da glicina amidinotransferase, enzima que utiliza Arg e glicina como substratos na síntese de creatina (Jones *et al.*, 1967). Por isso, o requerimento de metionina também deve ser considerado na relação antagônica entre Lys e Arg. Metionina é o doador de grupos metil para a formação de creatina e das poliaminas espermidina e espermina. Keshavarz & Fuller (1971) encontraram uma tripla interação entre Arg, metionina e Lys na taxa de crescimento das aves.

Com os constantes avanços tecnológicos obtidos e a utilização de aves altamente especializadas com grande potencial genético direcionado para o crescimento e demais índices zootécnicos de interesse, tem-se tornado comum a suplementação de Lys acima das recomendações das tabelas de exigências nutricionais (NRC, 1994 e Rostagno *et al.*,

2000; Rostagno *et al.*, 2005), ou dos manuais fornecidos pelos detentores do material genético, pelas grandes companhias avícolas (Nascimento, 2003).

O aumento na concentração de Lys, nas dietas, favorece a síntese protéica levando a maior rendimento de peito, tendo em vista que este é um aminoácido de alta proporção na proteína animal (Acar *et al.*, 1991).

Apesar de bem documentada, a relação antagônica entre Lys e Arg, as constantes modificações na conformação corporal do frango aumentaram significativamente a taxa de crescimento, impondo a premente necessidade de avaliação do equilíbrio metabólico ideal entre estes aminoácidos (Bilgili *et al.*, 1992).

A Lys é usada como aminoácido referência para estimar as exigências nutricionais dos demais aminoácidos, quando utilizado o conceito de proteína ideal nas formulações das dietas. Neste sentido, a Arg pode ser o aminoácido limitante para que a ave expresse o seu máximo potencial de ganho de peso. Além disso, dietas à base de milho e farelo de soja passam a representar fator, particularmente, sensível na disponibilidade de Arg para frangos de corte. Arg é o quinto aminoácido limitante nestas dietas, após metionina + cistina, Lys, treonina e triptofano (Atencio *et al.*, 2004).

O NRC (1994) propõe um nível de Lys digestível de 1,120% e uma relação de 105% com a Arg. As recomendações de Rostagno *et al.* (2000) são muito semelhantes. Propõem exigência de 1,140% de Lys digestível, e relação com a Arg de 102% para frangos de corte de 1 a 21 dias, com 3.000 kcal/kg de energia metabolizável e 21,40% de proteína bruta. Já, as recomendações da edição de 2005 (Rostagno *et al.*, 2005) indicam um requerimento específico para a fase de 1 a 7 dias, de 1,363% e uma relação com a Arg de 102% e de 1,189% de Lys e com a mesma relação para o período de 8 a 21 dias.

As exigências tendem a ser mais elevadas, segundo Vieira & Pophal (2000), quando considerado o período imediatamente pós-eclosão pelas diferenças nas taxas de crescimento e de ordem de síntese teciduais nos primeiros dias de vida, bem como a interferência com a nutrição proveniente do conteúdo do saco vitelino.

Segundo revisão destes autores, estudos muito recentes com pintinhos vêm demonstrando nova faceta da nutrição pós-eclosão relacionada com o desenvolvimento da capacidade máxima de deposição protéica e crescimento muscular. Neste sentido, a maximização do desempenho das aves nos primeiros dias de vida não passa apenas por uma maximização do desempenho vivo, mas também por uma visão que inclui maiores ganhos em rendimento de músculo.

Hudson & Levin (1968) e Pratt & Terner (1971) já havia demonstrado que os embriões são capazes de absorver aminoácidos antes mesmo da eclosão. Esta habilidade pode justificar o fato de pintinhos recém-eclodidos não terem problema para absorver aminoácidos. Tarvid (1992) observou que, um dia após a eclosão, os pintinhos já apresentavam carboxipeptidases A e dipeptidases ativas no lúmen do intestino. O autor concluiu que a presença de enzimas ativas não depende somente da idade dos pintinhos, mas também do início do processo de alimentação com dieta sólida.

Sklan & Noy (2004), estudando diferentes relações de aminoácidos na dieta, verificaram que ocorre aumento na deposição de Lys, treonina e Arg, enquanto a deposição dos outros aminoácidos permanece constante, observando que a eficiência de deposição diminui com a idade.

Burton & Waldroup (1997) encontraram exigência de Arg total de 1,40% em frangos de corte de 1 a 28 dias de idade, recebendo dieta com 1,26% de Lys e 21% de proteína bruta.

Mendes *et al.* (1997) e Brake *et al.* (1998) observaram melhor conversão alimentar à medida que a Arg foi adicionada às dietas dos frangos de corte. Labadan *et al.* (2001), também, apontaram necessidade maior de Arg para conversão alimentar do que para ganho de peso.

Por outro lado, Chamruspollert *et al.* (2001), citados por Atencio *et al.* (2004), registraram exigência de Arg total de 1,26%, para ganho de peso, e de 1,27%, para conversão alimentar, utilizando pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. Labadan *et al.* (2001) encontraram exigências de Arg total para as duas primeiras semanas de vida de 1,24 e 1,28%, respectivamente, para ganho de peso e conversão alimentar, valores inferiores aos de Arg total, obtidos para ganho de peso (1,31%), e conversão alimentar (1,32%) observados por Atencio *et al.* (2004).

Num estudo realizado por Gadelha (2004), com incrementos dietéticos de cinco níveis de Lys digestível (0,98; 1,23; 1,47; 1,72 e 1,96%) e dois níveis de Arg digestível (1,30 e 2,06%), na fase de 1 a 21 dias, o autor observou que os efeitos da adição de Lys, no desempenho produtivo dos frangos, foram dependentes do nível de Arg. O aumento dos níveis de Lys, no menor nível de Arg, causou depressão do ganho de peso e do consumo de ração. Entretanto, quando o nível de Arg foi aumentado, os efeitos depressivos desapareceram. Isto demonstra que o efeito de sobrecarga de Lys, no frango, pode ser equilibrado com Arg.

Já para o período final de crescimento, Costa *et al.* (2001b) não observaram efeito do nível de Arg sobre as características de desempenho utilizando frangos de corte de 22 a 42 dias de idade e sete relações Arg:Lys, variando de 95 a 132,5%, mantendo fixo o nível de Lys.

Em concordância, Atencio *et al.* (2004) também não obtiveram diferenças significativas nas características de desempenho e peso absoluto dos cortes com a adição crescente de Arg variando a relação com a Lys de 107 a 122%.

A crescente expansão da exportação de carne de frango pelo Brasil vem exigindo da indústria avícola a necessidade de melhorar a qualidade das carcaças. Entendendo como qualidade o conjunto de atributos que condicionam a aceitação de um produto pelo consumidor, esta pode ser comprometida pela presença da gordura na carcaça.

Quando há qualquer desbalanço, no fornecimento dos nutrientes, a deposição de gordura abdominal é aumentada, conclusão do trabalho de Gous & Morris (1985) que observaram declínio da gordura da carcaça de 18 para 8% quando a concentração de Lys da dieta aumentou de 0,6 para 1,6

Mendes *et al.* (1997) verificaram que o aumento da relação Arg:Lys melhorou a conversão alimentar e o rendimento de carcaça e reduziu a gordura abdominal em frangos de corte.

Costa *et al.* (2001b) trabalharam com dietas suplementadas com diferentes relações de Arg:Lys digestível (95,0; 102,5; 110,0; 117,5; 125,0; e 132,5%) e relataram que o aumento dessa relação melhorou linearmente o rendimento de pernas e diminuiu a deposição de gordura abdominal.

Na literatura, é citada a participação do sistema IGF no metabolismo lipídico (Goodridge *et al.*, 1989) e que o aumento do IGF-I plasmático está associado com a diminuição da gordura abdominal (McMurtry, 1998; Sun *et al.*, 2006). A Arg estimula a secreção de IGF-I, mecanismo que poderia explicar o efeito positivo da Arg na redução da gordura abdominal.

A produção de filés de peito com especificações rígidas de peso, comprimento e espessura para a exportação e produção de produtos pós-processados ou para restaurantes de comidas rápidas, tem implicações econômicas importantes para a rentabilidade da indústria avícola. Além da quantidade de carne obtida, após a desossa, existem outras características de qualidade, tais como pH, maciez, capacidade de retenção de água, cor e características sensoriais. O comprimento, a espessura e o peso

do filé do peito de frangos de corte são afetados por vários fatores como linhagem, sexo, nutrição e idade das aves (Dalanezi, 2002 citado por Mendes *et al.*, 2003).

Neste contexto, fica evidente que a intensa atividade na seleção das linhagens, pela necessidade econômica de se abater aves em menor tempo de vida, com rápido ganho de peso, possa resultar em comportamentos fisiológicos anormais.

O aumento, no consumo de produtos processados, evidenciou a ocorrência de problemas na qualidade de carne, associadas à dureza, baixa coesividade, cor e capacidade de retenção de água (Sosnick & Wilson, 1991; Dransfield & Sosnicki, 1999). Tais problemas são decorrentes dos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de aves com crescimento rápido e com grande rendimento do peito (*P. major*) em relação ao peso corporal. Neste tipo de seleção genética, observam-se, nos animais melhorados, o concomitante aumento do número de fibras de contração rápida (metabolismo glicolítico) e redução do número de fibras de contração lenta (metabolismo oxidativo); vascularização limitada; glicólise 'post mortem' acelerada e maior susceptibilidade ao estresse (Quiao *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003). Além disso, estudos comprovaram que este aumento no crescimento e na deposição de massa muscular é decorrente de um catabolismo protéico reduzido (Dransfield & Sosnick, 1999).

Outra preocupação dos nutricionistas é com respeito à contaminação ambiental. De acordo com Schutte (1994), a energia de uma dieta não pode ser criada nem destruída, o mesmo acontecendo com o nitrogênio. A parte do nitrogênio que não é utilizada pelo animal para o crescimento e produção é excretada na forma de ácido úrico. O nitrogênio é um dos mais sérios contaminantes ambientais oriundos da produção animal e notadamente da avicultura.

## Referências

Acar N, Moran Jr ET, Bilgili ES. Live performance and carcass yield of male broilers from two commercial strain crosses receiving rations containing lysine below and above the established requirement between six and eight weeks of age. *Poultry Science* 1991; 70(2):315-21.

Adams G, Mccue SA. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *Journal Applied Physiology* 1998; 84(5):1716-22.

Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *Journal American Medicine Association* 1996; 209:1297-302.

Aguila MC. Growth hormone-releasing factor increase somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Science* 1994; 94:782-86.

Alba-Roth J, Müller OA, Schopohl J, Werder K. Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1988; 67:1186-89.

Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 1998; 10(3):263-68.

Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995; 314(2):266-80.

Ash DE. Structure and Function of Arginases. *Journal of Nutrition* 2004; 134(10):2760–4.

Assis MQTM, Gruber GL, Hofmeister AW, Guimarães AMP. Avaliação do percentual de descarte na condenação parcial de frangos *Revista Nacional da Carne* 2003; 313:76-81.

Atencio A, Albino LFT, Rostagno HS, Oliveira DC, Vieites FM, Pupa JMR. Exigência de arginina digestível para frangos de corte machos em diferentes fases. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2004; 33(6):1456-66.

Austic R. Conversion of Arginine to Proline in the Chick. *Journal of Nutrition*. 1973; 103(7): 999-1007.

Austic RE, Nesheim MC. Arginine, ornithine and proline metabolism of chicks: Influence of diet and heredity. *Journal of Nutrition* 1971; 101(10):1403–13.

Austic RE, Scott RL. Involvement of food intake in the lysine-arginine antagonism in chicks. *Journal of Nutrition* 1975; 105(9):1122-31.

Ball RO., Urschel, KL, Pencharz, PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *Journal of Nutrition* 2007; 137(6):1626–1641.

Balnave D, Brake J. Re-evaluation of the classical dietary arginine:lysine interaction for modern growing poultry and diets: a review. *World's Poultry Science Journal* 2002; 58:275-89.

Banks WJ. Tecido muscular. In: Banks WJ, editor. *Histologia veterinária aplicada*. 2 ed. São Paulo(SP): Manole Ltda; 1992. p. 215-36.

Bansal V, Rodriguez P, Wu G, Eichler DC, Zabaleta J, Taheri F, Ochoa JB. Citrulline can preserve proliferation and prevent the loss of CD3 z chain under conditions of low arginine. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2004; 28(6):423–430.

Baron-Davis S, Sweeney S. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 1999; 167(4):301-5.

Baylink, DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *Journal Bone Mineral Research* 1993; 8:565-72.

Bedford MR, Smith TK, Summers JD. Effect of dietary lysine on polyamine synthesis in the chick. *Journal of Nutrition* 1987; 117(11):1852–8.

Belo PS, Romsos DR, Leveille GA. Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken. *Journal of Nutrition* 1976; 106(8):1135-43.

Bilgili SF, Moran ET, Acar N. Strain-cross response of heavy male broilers to dietary lysine in the finisher period. *Poultry Science* 1992; 71(4):850-8.

Bolea S, Pertusa JAG, Martín F, Sanchez-Andrés JV, Soria B. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *European Journal of Physiology* 1997; 433:699-704.

Brake J, Balnave D, Dibner JJ. Optimum dietary arginine:lysine ratio for broiler chickens is altered during heat stress in association with changes in intestinal uptake and dietary sodium chloride. *British Poultry Science* 1998; 39(2):639-47.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling, N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179:77-79.

Brenman JE, Bredt DS. Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods in Enzymology* 1996; 269:119-29.

Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5(8):641-54.

Brosnan ME, Brosnan JT. Renal Arginine Metabolism *Journal of Nutrition* 2004; 134(10):2791-5.

Burton EM, Waldroup P. Arginine and lysine needs of young broiler chicks. *Nutrition International* 1997; 19(4):607-14.

Ceccatelli S. Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrine system. *Brain Research Bulletin* 1997; 44(3):533-38.

Chevalley T, Rizzoli R, Manen D, Caverzasio J, Bonjour JP. Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. *Bone* 1998; 23:103-9.

Chu SW, Nesheim MC. The Relationship of Plasma Arginine and Kidney Arginase Activity to Arginine Degradation in Chickens. *Journal of Nutrition* 1979; 109(10):1752-8.

Cogburn LA, Burnside J, Scanes CG. Physiology of growth and development. In: Whittow GC, editor.. *Avian physiology*. 5 ed. London: Academic Press; 2000. p.635-49.

Colemann ME, Demayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(20):12190-12116.

Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P. bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *Journal of Cellular Biochemistry* 1995; 57:399-408.

Conconi MT, Tommasini M, Muratori E, Parnigotto PP. Essential amino acids increase the growth and alkaline phosphatase activity in osteoblasts cultured in vitro. *IL Fármaco* 2001; 56:755-61.

Corr SA, Gentle MJ, Mccorquodale CC, Bennett D. The effect of morphology on the musculoskeletal system of the modern broiler. *Animal Welfare* 2003; 12(1):142-57.

Corzo A, Moran Jr ET, Hoehler D. Arginine Need of Heavy Broiler Males: Applying the Ideal Protein Concept. *Poultry Science* 2003; 82(3):402-7.

Costa FGP, Rostagno HS, Albino LFT. Níveis de lisina digestível para frangos de corte machos na fase de 21 a 42 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001a; 30(5):1490-7.

Costa FGP, Rostagno HS, Toledo, RS, Albino LFT. Efeito da relação arginina:lisina sobre o desempenho e qualidade de carcaça de frangos de corte de 3 a 6 semanas de idade, em condições de alta temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001b; 30(6):2021-25.

Czarnecki GL, Hirakawa DA, Baker DH. Antagonism of arginine by excess dietary lysine in the growing dog. *Journal of Nutrition* 1985; 115(6):743–52.

De Jonge WJ, Kwikkers KL, Te Velde AA, Van Deventer SJH, Nolte MA, Mebius RE, Ruijter JM, Lamers MC, Lamers WH. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *Journal Clinical Investigation* 2002; 110(10):1539–48.

Deng K, Wong CW, Nolan JV. Long-term effects of early life L-arginine supplementation on growth performance, lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. *British Poultry Science* 2005; 46:318–24.

Dhanakoti SN, Brosnan JT, Herzberg GR, Brosnan ME. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. *American Journal of Physiological*. 1990; 259(3):437–42.

Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death & Differentiation* 1999; 6(10), 964-8.

Dransfield E, Sosnicki AA. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Science* 1999; 78(5):743-46.

Dubowitz V, Brooke M. *Muscle biopsy: a modern approach*. London: W.B. Saunders Company; 1984. p. 472.

Duclos MJ, Wilkie RS, Goddard C. Stimulation of DNA synthesis in chicken muscle satellite cells by insulin and insulin-like growth factors: evidence for exclusive mediation by a type-I insulin-like growth factor receptor. *Journal Endocrinology* 1991; 128:35-42.

Duclos MJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA levels and chicken muscle growth. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 56(3):25-35.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39:343-50.

Edmonds MS, Baker DH. Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick. *Journal of Animal Science* 1987; 65(3):699–705.

Edwards Jr HM. Nutrition and skeletal problems in poultry. *Poultry Science* 2000; 79(7):1018-23.

Edwards Jr HM. Nutritional factors and leg disorders. In: Whitehead CC, editor. *Bone biology and skeletal disorders in poultry*. Abingdon: Carfax Publishing Company; 1992. p.167-93.

Elkin RG, Featherston WR, Rogler JC. Investigations of leg abnormalities in chicks consuming high tannin sorghum grain diets. *Poultry Science* 1978; 57(4):757-62.

Emmerson DA, Anthony NB, Nestor KE. Genetic Association of selection for increased leg muscle and increased shank diameter with body composition and walking ability. *Poultry Science* 1991; 709(4):739-45.

Estrada C, Murillo-Carretero M. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 2005; 11(4):294-307.

Feelisch M, Te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 1994; 368:(6466), 62-5.

Fernández AM, Dupont J, Farrar RP, Sukho L, Stannard B, Roith DL. Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109(3):347-55.

Field CJ, Johnson IR, Pratt VC. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. *Medicine & Science & Sports Exercise* 2000; 32(7):377-388.

Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrinology Review* 1996; 17:481-517.

Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase-characterization and purification from different cell types. *Biochemistry Pharmacology* 1991; 42:1849-1857.

Froesch ER, Schimid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insuline-like growth factors. *Annual Review of Physiology* 1985; 47:443-67.

Gadelha, AC. Resposta produtiva, imune e desenvolvimento ósseo de frangos de corte alimentados com diferentes relações de arginina e lisina digestíveis. [Tese]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004.

Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2000; 10:223-38.

Ghigo E, Bellone J, Mazza E, Imperiale E, Procopio M, Valente F, Lala R, Sanctis C, Camanni F. Arginine potentiates the GHRH- but not the pyridostigmine-induced GH secretion in normal short children. Futher evidence for a somatostatin suppressing effect of arginine. *Clinical Endocrinology* 1990; 32:763-67.

Ghigo E, Ceda GP, Valcavi R, Goffi S, Zini M, Mucci M, Valenti G, Cocchi D, Muller EE, Camanni F. Low doses of either intravenously or orally administered arginine are able to enhance growth hormone response to growth hormone releasing hormone in elderly subjects. *Journal of Endocrinological Investigation* 1994; 17:113-22.

Gomes Filho, M. A. Participação da Arg na regulação da expressão gênica do hormônio do crescimento (GH) em ratos. [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1999.

Gonzales E, Macari M. Enfermidades metabólicas em frangos de corte. In: Berchieri Jr A, Macari M, editores. Doenças das aves. Campinas:Facta; 2000. p.449-64.

Gonzales E, Sartori Jr. Crescimento e metabolismo muscular. In: Macari M, Furlan RL, Gonzáles E, editores. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. 2 ed. Jaboticabal: Funep-Unesp; 2002. p.279-97.

Gonzalez, F.H.D.; Haida, K.S.; Mahl, D. Incidence of Metabolic Diseases in Broilers of Southern Brazil and Use of Blood Biochemical Profile for Its Study. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2001;3(2):141-7

Gonzalez-Esquerre R, Leeson S. Concentrations of Putrescine, Spermidine, and Spermine in Duodenum and Pancreas as Affected by the Ratio of Arginine to Lysine and Source of Methionine in Broilers Under Heat Stress. *Poultry Science* 2006; 85(8):1398–1408.

Goodridge AG, Crish JF, Hillgartner FB, Wilson SB. Nutritional and hormonal regulation of the gene for avian malic enzyme. *Journal of Nutrition* 1989; 119(2):299-308.

Gous RM, Morris TR. Evaluation of a diet dilution technique for measuring the response of broiler chickens to increasing concentrations of lysine. *British Poultry Science* 1985; 26:147-61.

Grazi E, Magri E, Balboni G. On the Control of Arginine Metabolism in Chicken Kidney and Liver. *European Journal of Biochemistry* 1975; 60(2):431-6.

Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxides synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annual Review Physiology*. 1995; 57:707-736.

Grisham MB, Jourdeuil D, Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology* 1999; 276(2):315–321.

Guernec A, Chevalier B, Duclos MJ. Nutrient supply enhances both IGF-I and MSTN mRNA levels in chicken skeletal muscle. *Domestic Animal Endocrinology* 2004; 26(2):143-54.

Halevy O, Geyra A, Barak M, Uni Z, Sklan, D. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *Journal of Nutrition* 2000; 130(4):858-64.

Hare JM, Johnson RJ. Uric acid predicts clinical outcomes in heart failure: Insights regarding the role of xanthine oxidase and uric acid in disease pathophysiology. *Circulation* 2003; 107:1951–1953.

Harper AE, Benevenga NJ, Wohlhueter RM. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological Reviews* 1970; 50(3):428–558.

Hartman S, Taleb SA, Geng T, Gyenai K, Guan X, Smith E. Comparison of Plasma Uric Acid Levels in Five Varieties of the Domestic Turkey, *Meleagris gallopavo*. Poultry Science 2006; 85(10):1791–4.

Hawke JT, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. Journal Applied Physiology 2001; 91(3):534–51.

Hellman B, Sehlin J, Täljedal I-B. Uptake of alanine, arginine, and leucine by mammalian pancreatic  $\beta$ -cells. Endocrinology 1971; 89(1):432-39.

Hickling D, Guenter W, Jackson ME. The effects of dietary and lysine on broiler chicken performance and breast meat yield. Canadian Journal Animal Science 1990; 709:673-78.

Hobbs AJ, Ignarro LJ. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. Methods in Enzymology 1996; 269:134-48.

Holsheimer JP, Veerkamp CH. Effect of dietary energy, protein, and lysine content on performance and yields of two strains of male broiler chicks. Poultry Science 1992; 71(5):872-79.

Hudson DA, Levin RJ. The ontogeny of electrical activity associated with absorption of solutes across the developing small intestines of the chicks (*Gallus domesticus*). Journal of Physiology 1968; 195:369-85.

Hui L, Meininger CJ, Hawker, JR, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM, Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. American Journal Physiological Endocrinology Metabolism 2001; 280 (1):75–82.

Hukkanen MVJ, Platts, L.A.M. Marticorena, I.F.; O'shaughnessy, M.; Macyntire, I., Polak, J.M. Developmental regulation of nitric oxide synthase expression in rat skeletal bone. Journal Bone Mineral Research 1999; 14:868-77.

Isaksson OG, Lindahl A, Nilson A, Isagaard J. Mechanism of stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone. Endocrinology Review 1987; 8:426-38.

James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiology Reviews 1995; 59:533-47.

Jones JD, Petersburg SJ, Burnett PC. The mechanism of the lysine-arginine antagonism in the chick: effect of lysine on digestion, kidney arginase, and liver transaminase. Journal of Nutrition 1967; 93(1):103–16.

Jones JD. Lys-arg antagonism in the chick. Journal of Nutrition 1964; 849(3):313–21.

Kadirvel R, Kratzer FH. Uptake of L-arginine and L-lysine by the small intestine and its influence on arginine-lysine antagonism in chicks. Journal of Nutrition 1974; 104(3):339–43.

Kato M. Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992; 131(2):133-38.

Kelijman M, Frohman LA. The role of the cholinergic pathway in growth hormone feedback. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 72:1081-087.

Kennedy JA, Kirk SJ, Mccrory DC, Halliday MI, Barclay GR, Rowlands, BJ. Modulation of immune function and weight loss by L-arginine in obstructive jaundice in the rat. *British Journal of Surgery* 1994; 819:1199-1201.

Kepka-Lenhardt D, Mistry SK, Wu G, Morris SM. Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *American Journal of Physiology* 2000; 279(6):2237-42.

Keshavarz K, Fuller HL, Relationship of arginine and methionine in the nutrition of the chicks and the significance of creatine biosynthesis in their interaction. *Journal of Nutrition* 1971; 101(2):217-22.

Kestin SC, Gordon S, SU G, Sorensen, P. Relationship in broiler chickens between lameness, liveweight, growth rate and age. *Veterinary Record* 2001; 148:195-97.

Kidd MT, Peebles ED, Whitmarsh SK, Yeatman JB, Wideman Jr RF. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. *Poultry Science* 2001, 80(11):1535-42.

Kidd MT. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science* 2004; 83(4):650-57.

Kikuchi K, Buonomo FC, Kajimoto Y, Rotwein P. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development. *Endocrinology* 1991; 128(3):1323-28.

Klose AA, Stokstad ELR, Almquist HJ. The ability of citrulline to replace arginine in the diet of the chick. *Journal Biological Chemistry* 1938; 123:691-698.

Kobayashi T, Yamamoto M, Hiroi T, Mcghee J, Takeshita Y, Kiyono H. Arginine enhances induction of T helper 1 and T helper 2 cytokine synthesis by Peyer's patch alpha beta T cells and antigen-specific mucosal immune response. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1998; 62:2334-40.

Konashi S, Takahashi K, Akiba Y. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on immunological variables in broiler chickens. *British Journal Nutrition* 2000; 83: 449-456.

Kwak H, Austic RE, Dietert RR. Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. *Poultry Science* 1999; 78(11):1536-41.

Labadan Jr MC, Hsu KN, Austic RE. Lysine and arginine requirements of broiler chickens at two to three weeks intervals to eight weeks of age. *Poultry Science* 2001; 80(5):599-606.

Le Floch N, Melchior D, Obled C. Modification of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Science* 2004; 87(1-2):37-45.

Leach RM, Gay CV. Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. *Journal of Nutrition* 1987; 117(5):784-90.

Lebien TW. Arginine: an unusual dietary requirement of pre-B lymphocytes? *The Journal of Clinical Investigation* 2002; 110:1411-13.

Leclercq B. Specific effects of lysine on broiler production: Comparison with threonine and valine. *Poultry Science* 1998; 77(1):118-123.

Lee JE, Austic RE, Naqi SA, Golemboski KA, Dietert RR. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. *Poultry Science* 2002, 81(6):793-98.

Leeson S, Summers JD. *Nutrition of the chicken*. 4 ed. Guelph: University Books; 2001.

Leeson S, Summers JD. Some nutritional implications of leg problems with poultry. *British Poultry Science* 1988, 144:81-92.

Leningher AL. *Princípios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo(SP): Sarvier; 2002.

Lewis B, Langkamp-Henken B. Arginine enhances *in vivo* immune responses in young, adult and aged mice. *Journal of Nutrition* 2000; 130(7):1827-30.

Li P, Yin Y, Li D, Kim SW, Wu G. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition* 2007; 98:237-252.

Lonergan SM, Deeb N, Fedler CA, Lamont SJ. Breast meat quality and composition in unique chicken populations. *Poultry Science* 2003; 82(12):1990-94.

Machida S, Booth FW. Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004; 63(2):337-40.

Marks SC, Odgren PR. *Principles of bone biology*. London: Academic Press; 2002.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:12231-234.

McMurthy JP, Francis GL, Upton Z. Insulin-like growth factors in poultry. *Domestic Animal Endocrinology* 1997; 149:199-229.

McMurtry JP. Nutritional and developmental roles of insulin-like growth factors in poultry. *Journal of Nutrition* 1998; 128(2):302-05.

Meijer AJ, Lamers WH, and Chamuleau AFM. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews* 1990; 70(3):701-748.

Mendes AA, Moreira J, Garcia RG. Qualidade da carne de peito de frango de corte. *Revista Brasileira da Carne* 2003; 317:138-144.

Mendes, A.A., Watkins, S.E., England, J.A. Influence of dietary lysine levels and arginine:lysine ratios on performance of broilers exposed to heat or cold stress during the period of three to six weeks of age. *Poultry Science* 1997; 76(3):472-81.

Merimee JT, Rabinowitz D, Fineberg SE. Arginine-initiated release of human growth hormone. Factors modifying the response in normal man. *New England Journal Medicine* 1969; 280:1434-438.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology Review* 1991, 43:109-42.

Moore T, Ferket, PR, Mozdziak PE. Muscle development in the late embryonic and early post-hatch poult. *International Journal of Poultry Science* 2005; 4(3):138-142.

Moraes GHK, Rogler JC, Featherston WR. Effects of nonspecific deficiency on growth rate and leg problems in chicks. *Poultry Science* 1984; 63(2):344-53.

Moran ET, Bilgili SF. Processing losses, carcass quality and meat yields of broiler chickens receiving diets marginally deficient to adequate lysine prior to marketing. *Poultry Science* 1990; 6(5):702-710.

Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anatomical Record* 1971; 170:421-36.

Moss FP. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. *American Journal of Anatomy* 1968; 122:555-63.

Murakami AE, Oviedo-Rondon EO, Martins EN, Pereira MS, Scapinello C. Sodium and chloride requirements of growing broiler chickens (twenty-one to forty-two days of age) fed corn-soybean diets. *Poultry Science* 2001; 80(3):289-94.

Nascimento AA. Lisina otimiza a conversão alimentar. *Revista Ave World* 2003; 1(5):48-50.

Nathan NC, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78:915-18.

Nelson TS, Kirby LK, Johnson ZB. Effect of calcium, phosphorus and energy on the incidence of weak legs in heavy male broiler. *Journal Applied Poultry Research* 1992; 1(1):11-18.

Nesheim MC, Christensen DA, Arnold DL. Arginine deficiency in two strains of chicks selected for differences in dietary requirements of arginine. *Journal of Nutrition* 1967; 92(3):365.

Newberne PM, Savage JE, O'dell BL. Pathology of arginine deficiency in the chick. *Journal of Nutrition* 1960; 729 (4):347-52.

Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical Science* 2005; 108:185–194.

NRC. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry*. 8<sup>th</sup> rev. ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Oviedo EO, Ferket PR. Nutritional factors that affect leg problems in meat poultry: A Review. In: Ferket PR, editor. *Proceedings of the 32nd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference*; 2005; North Carolina: Carolina Feed Industry Association in Cooperation with NC State University; 2005. p.58.

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-66.

Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Batista, J.A.; Martel Pelletier, J. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and Rheumatism* 1998; 41:1275-86.

Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in Guinea pig and rabbits. *Biochemistry* 1972; 11:2627- 33.

Pierson FW, Hester PY. Factors influencing leg abnormalities in poultry: A review. *World's Poultry Science Journal* 1982; 38:5-17.

Pines M, Hurwitz S. The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poultry Science* 1991; 70(10):1806-14.

Pizauro JR, Ciancaglini P, Macari M. Discondroplasia Tibial: mecanismos de lesão e controle. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2002; 4(3):169-85.

Prabhakar SSG, Zeballos A, Montoya-Zavala M, Leonard C. Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *American Journal of Physiological* 1997; 273(6):1882–8.

Pratt JR, Temer C. Development of amino acid transport by the small intestine of the chick embryo. *Biochimica et Biophysica Acta* 1971; 225:113-122.

Prall CA, Ford BC, Gay CV, Pines M, Leach RM. Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 2000; 79(7):1009-1013.

Quiao M, Fletcher DL, Northcutt JK, Smith DP. The relationship between raw broiler breast meat color and composition. *Poultry Science* 2002; 81(3):422-27.

Quinn PRO, Knabe DA, Wu G. Arginine catabolism in lactating porcine mammary tissue. *Journal of Animal Science* 2002; 80(2):467–74.

Qureshi MA, Brake J, Balnave D. and Kidd MT. Effect of environmental temperature and arginine:lysine ratio on broiler macrophage and monocyte function. *Poultry Science* 2000; 79(1):64.

Rath NC, Huff GR, Huff WE, Balog JM. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Science* 2000; 79(7):1024-32.

Rath NC, Huff WE, Bayari GR, Balog JM. Cell death in avian tibial dyschondroplasia. *Avian Diseases* 1998; 42:72-79.

Reddi, AH. Initiation and promotion of endochondral bone formation by bone morphogenetic proteins: potential implications for avian tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 2000; 79(6):978-981.

Rens-Domiano S, Reisine T. Biochemical and functional properties of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry* 1992; 58:1987-996.

Roith DL, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin Hypothesis:2001. *Endocrine Reviews* 2001; 22(1):53-74.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2000. 141p.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 2 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2005. 185p.

Ruiz-Feria CA, Kidd MT, Wideman, RF. Plasma Levels of Arginine, Ornithine, and Urea and Growth Performance of Broilers Fed Supplemental L-Arginine During Cool Temperature Exposure. *Poultry Science* 2001; 80(3):358-69.

Salvemini D, Wang Z, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology* 1996; 118:829-38.

Sams AR. Meat quality during processing. *Poultry Science* 1999; 78( ):798-803.

Sartori JR, Gonzales E, Macari M, Pai VD, Oliveira HN. Tipos de Fibras no Músculo Flexor Longo do Hálux de Frangos de Corte Submetidos ao Estresse pelo Calor e Frio e Alimentados em "Pair-Feeding" *Revista Brasileira de Zootecnia* 2003; 32(4):918-925.

Schmidt HHHW, Walter U. NO at work. *Cell*, 78(6):919- 925, 1994.

Schutte JB. Effects the protein dietary on environment. *Feed Mix* 1994; 2:28-31.

Schwander JC, Hauri C, Zapf F, Froesch EF. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependency on growth hormone status. *Endocrinology* 1983; 113:297-305.

Sekine T, Ueno K, Watanabe E, Kadowaki W, Ishibashi T. Effect of dietary and arginine levels on bone development in broiler chicks. *Animal Science and Technology* 1996; 67(1):7-13.

Sekine T, Watanabe E, Ishibashi T. Influence of dietary amino acids and calcium-available phosphorus on bone development of female broiler chicks. *Animal Science and Technology* 1994; 65(9):999-1007.

Silva FA, Moraes GHK, Rodrigues ACP, Oliveira MAO, 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. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001; 30(6):2067-77.

Sklan D, Noy Y. Catabolism and deposition of amino acids in growing chicks: effect of dietary supply. *Poultry Science* 2004; 83(6):952-61.

Smith TK influence of dietary ornithine and methionine on growth, carcass composition, and polyamine metabolism in chickens. *Canadian Journal Animal Science* 1981; 61:1005-1012.

Sosnicki AA, Wilson BW. Pathology of turkey skeletal muscle. Implications for the poultry industry. *Food Structure* 1991; 10:317-26.

Stutz MW, Savage JE, O'Dell BL. Relation of dietary cations to arginine:lysine antagonism and free amino acid pattern in chicks. *Journal of Nutrition* 1971; 101(3):377-384.

Sun JM, Richards MP, Rosebrough RW, Ashwell CM, McMurtry JP, Coon CN. The relationship of body composition, feed intake and metabolic hormones for broiler breeder females. *Poultry Science* 2006; 85(7):1173-84.

Sung YJ, Hotchikiss JH, Austic RE, Dietert RR. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *Journal of Leukocyte Biology* 1991; 50:49-56.

Tamir H, Ratner S. Enzymes of arginine metabolism in chicks. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1963; 102:249-258.

Tarvid I. Effect of early postnatal long-term fasting on the development of peptide hydrolysis in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1992; 101:161-6.

Tayade C, Jaiswal TN, Mishra SC, Madhuri K. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. *Vaccine* 2006; 24:552-60.

Thorp BH. Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathology* 1994; 23:203-36.

Tureckova J, Wilson EM, Cappalonga JL, Rotwein P. Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(42):39264-70.

Valverde I, Peñalva A, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C. Involvement of Nitric Oxide in the Regulation of Growth Hormone Secretion in Dogs. *Neuroendocrinology* 2001; 74:213-9.

Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001; 103:255-61.

Vasilatos-Younken R, Scanes CG. Growth hormone and insulin-like growth factors in poultry growth: required, optimal or ineffective? *Poultry Science* 1991; 70(11):1764-80.

Vieira SL, Pophal S. Nutrição pós-eclosão de frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2000; 3(3):123-37.

Waldroup PW. Dietary nutrient allowances for chickens and turkeys. *Poultry Health & Nutrition. Feedstuffs* 2002; 10:44-50.

Whitehead CC. Bone biology and skeletal disorders in poultry. Abingdon: Carfax Publishing Company, 1992.

Widemann RF, Kirby JR, Ismail IK, Bottje M, Moore WG, Valderman RC. Supplemental L-arginine attenuates pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers. *Poultry Science* 1995; 74(2):323-30.

Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 2001; 64(4):365–391.

Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *American Journal of Physiological*. 1981; 241(6):473-80.

Wu G and Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* 1998; 336:1–17.

Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *Journal of Nutrition* 1999; 129(7):1347–1354.

Wu G, Flynn NE, Yan W, Barstow DG. Glutamine metabolism in chick enterocytes: absence of pyrroline-5-carboxylase synthase and citrulline synthesis. *Biochemical Journal* 1995; 306:717-21.

Wu G. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *American Journal of Physiological* 1997; 272(1): 1382-90.

Yun CH, Han YJ, Park BC, Lee HS. Effect of lisyne and sodium on the growth performance bone parameter, serum composition and lisyne-arginine antagonism in broiler chicks. *Asian Australian Journal of Animal Sciences* 1991; 44(2):353-60.

## **II - OBJETIVOS GERAIS**

Esta pesquisa foi desenvolvida com a finalidade de estudar o efeito da suplementação de Arg e Lys na dieta inicial sobre as características produtivas, o metabolismo e crescimento ósseo, o desenvolvimento muscular e dos órgãos linfóides e a morfometria da pele e da mucosa intestinal de frangos de corte.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito do antagonismo entre Arg e Lys sobre os parâmetros zootécnicos, a morfometria da pele e os níveis plasmáticos do IGF-I e seu reflexo sobre o metabolismo e crescimento ósseo dos frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade.

Avaliar o efeito da suplementação de Arg, em diferentes níveis dietéticos, sobre comportamento das características produtivas, o desenvolvimento da fibra muscular esquelética e dos órgãos linfóides e na morfometria da mucosa intestinal de frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade.

### **III – Avaliação do Antagonismo entre Arginina e Lisina na Dieta Inicial sobre o Desempenho Produtivo e a Espessura da Pele de Frangos de Corte**

RESUMO: A finalidade deste estudo foi avaliar o efeito do antagonismo entre arginina (Arg) e lisina (Lys) sobre os parâmetros zootécnicos e a morfometria da pele de frangos de corte suplementados com níveis crescentes de Arg e Lys, no período inicial de 1 a 21 dias. Foram utilizados 1.760 pintos de corte, Cobb, machos, os quais foram alocados aleatoriamente de acordo com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial quatro x quatro (níveis de Lys e Arg) totalizando 16 tratamentos com duas repetições e 55 aves por unidade experimental. As dietas iniciais foram formuladas para conter 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível. Aos 21 dias foi observada interação ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de Lys e Arg para o peso vivo e a conversão alimentar, demonstrando que níveis de Lys acima do recomendado deprimem o peso das aves, mas este efeito pode ser amenizado pela adição de níveis extremamente altos de Arg. O desempenho das aves na fase de crescimento (22 a 42 dias) foi influenciado pela suplementação de Arg e Lys na dieta inicial. A taxa de mortalidade aumentou ( $p < 0,05$ ) em resposta à suplementação de ambos os aminoácidos. Por outro lado, a combinação de níveis acima da exigência de ambos os aminoácidos, na fase inicial contribuiu positivamente ( $p < 0,05$ ) na espessura da camada da derme da pele dos frangos de corte na idade de abate, provavelmente pelo envolvimento de Arg e Lys na biossíntese do colágeno. Níveis excessivos de aminoácidos interferem no desempenho em consequência do desequilíbrio na dieta e do maior gasto energético para sua biotransformação e eliminação. O excesso de Lys, ainda, pode estar envolvido com a degradação da Arg em ornitina e uréia, o que pode alterar a síntese de óxido nítrico.

Palavras-chave: aminoácidos, peso vivo, consumo de ração, colágeno

### **III – Evaluation of antagonism between Arginine and Lysine in the initial diet on performance and skin morphometrics of broiler chickens**

**ABSTRACT:** This trial evaluated the antagonism between arginine (Arg) and lysine (Lys) on productive characteristics and skin layer morphometrics of broiler chickens during the initial period (1 and 21 days of age). One thousand seven hundred and seventy-six male Cobb broilers were reared in a randomized factorial 4 x 4 design (Lys and Arg levels), with two replications of 55 birds each. Experimental diets were formulated to contain 1.189%; 1.427%; 1.665% and 1.902% digestible Lys levels and 1.217%; 1.416%; 1.615% and 1.814% digestible Arg levels. There was interaction ( $p < 0.05$ ) on the 21<sup>st</sup> day between Lys and Arg levels in weight gain and feed:gain ratio, demonstrating that Lys levels above the recommended lower decreased broilers' weight. However, effect may be lessened by the addition of extremely high Arg levels. The productive characteristics in the growth phase (22 - 42 days) were influenced by supplementation to the initial diet. Mortality increased ( $p < 0.05$ ) in response to Lys and Arg supplementation. On the other hand, the addition of levels above requirements of both amino acids in the initial phase contributed positively ( $p < 0.05$ ) to the thickness of the dermal skin layer of the broiler chickens at 42 days of age, probably due to the involvement of Arg and Lys in collagen biosynthesis. Extreme amino acid levels may be harmful to performance as a consequence of the imbalance in diet and the highest energy expenditure in metabolism and excretion. Excess Lys may still be involved in the degradation of Arg in ornithine and urea, modifying the nitric oxide synthesis.

**Key words:** amino acids, body weight, feed intake, collagen.

## Introdução

Lisina (Lys) é um aminoácido dietético, indispensável para todas as espécies animais já estudadas (Ball et al, 2007). É o aminoácido dietético mais limitante para a síntese de proteína corporal, o que explica a vasta literatura disponível a respeito da exigência de Lys, em diferentes espécies, quando comparada com outros aminoácidos. A essencialidade da arginina (Arg), por outro lado, está condicionada à espécie animal e dentro da espécie, à condição fisiológica, pela variável capacidade de síntese endógena.

A exigência de Lys, em qualquer espécie animal, é influenciada primeiramente pela exigência para a síntese protéica e para a síntese de carnitina, enquanto a exigência de Arg é influenciada por muitos fatores. Além da síntese protéica, inclui a síntese ‘de novo’, participação do processo de depuração nitrogenada por meio do ciclo da uréia nas espécies ureotélicas e a síntese de compostos não protéicos como a creatina, óxido nítrico, poliaminas, prolina e uréia.

O principal produto do metabolismo excretório de compostos nitrogenados das aves é o ácido úrico e sua formação não é dependente de Arg, assim como não há síntese ‘de novo’ de Arg.

Deste modo, a exigência de Arg, para as aves, é resultante do requerimento para a síntese protéica, síntese de metabólicos e para repor a Arg que é degradada pela arginase renal na formação de ornitina, que também não é sintetizada em aves, alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais linhagens de corte, além da interação metabólica entre Lys e Arg (Edmonds *et al.*, 1987). Em consequência, é o mais alto requerimento entre as espécies animais estudadas (Ball et al, 2007).

Estas diferenças metabólicas entre Lys e Arg são relevantes na compreensão do mecanismo antagônico entre estes aminoácidos, que é desencadeado por níveis elevados de Lys que afetam adversamente o metabolismo da Arg, aumentando sua exigência.

O efeito negativo do antagonismo entre Lys e Arg, no ganho de peso, não se deve apenas à redução do consumo alimentar, como observado quando há um desequilíbrio entre aminoácidos, mas por outros efeitos sobre o metabolismo e a utilização da Arg (Harper *et al.*, 1970). Conseqüentemente, há uma exigência metabólica, mas não necessariamente dietética de Arg nesta situação. Isto é, particularmente, importante no que diz respeito à variação da exigência de Arg e do efeito negativo do antagonismo em pintinhos e aves adultas (Ball *et al.*, 2007).

Das espécies estudadas, apenas aves, cães e ratos apresentam relação antagonista evidente entre Lys e Arg. Entretanto, o exato mecanismo não foi, ainda, totalmente, elucidado em nenhuma destas espécies. Ambos os aminoácidos compartilham e competem por transportadores intestinais e renais, entretanto, não há evidências que comprovem que o antagonismo é por esta competição (Kadirvel *et al.*, 1974; Czarnecki *et al.*, 1985). Em aves, particularmente, a atividade da arginase renal é marcadamente aumentada pelo excesso de Lys na dieta (Jones *et al.*, 1967), o que poderia causar um elevado catabolismo da Arg, e, assim, explicar o antagonismo observado nestas espécies. Entretanto, a elevação da atividade da arginase renal não é a única causa do antagonismo, porque o aumento plasmático desta enzima não é detectado antes de 2 a 4 dias, após a ingestão de uma dieta rica em Lys, apesar da diminuição significativa do nível plasmático de Arg dentro de 6 h após a administração da dieta (Ball *et al.*, 2007).

Neste sentido, a estratégia de elevar o nível de Lys das rações de frangos de corte, nas atuais linhagens de conformação permite a máxima eficiência genética em deposição de proteína muscular e melhor conversão alimentar, entretanto, pode alterar o equilíbrio metabólico ideal com a Arg.

Além disso, o uso exclusivo de dietas à base de milho e farelo de soja, em detrimento aos ingredientes de origem animal, passou a representar um fator particularmente sensível na disponibilidade de Arg para os frangos de corte. Arg é o quinto aminoácido limitante nestas dietas, após metionina + cistina, Lys, treonina e triptofano (Atencio *et al.*, 2004).

O desequilíbrio entre Arg e Lys, em dietas de frangos de corte, pode alterar a resposta produtiva, a incidência de problemas locomotores, a formação de penas e ainda influir na síntese de óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula derivada da Arg, que atua como mensageiro celular nos mecanismos de resistência contra agentes infecciosos e participa da neurotransmissão cerebral e do vasorrelaxamento dependente do endotélio (Dusse *et al.*, 2003). Mais recentemente, o NO vem sendo estudado pelo envolvimento na regulação do consumo alimentar de frangos de corte (Denbow, 1999). A aplicação de um inibidor da óxido nítrico sintetase, enzima que converte Arg em NO, diminuiu o consumo, mas, a administração conjunta com Arg restaurou o consumo de ração.

A Arg é também considerada um potente secretagogo, que aumenta a liberação na corrente sanguínea da insulina, hormônio do crescimento (GH) e IGF (Newsholme *et al.*, 2005), provavelmente pela rápida despolarização da membrana plasmática ligada ao transporte de aminoácidos com a cadeia lateral positiva.

O IGF tem papel importante na deposição de colágeno, incluindo os colágenos tipo I e III, predominantes na pele. Por outro lado, prolina e Lys são os principais aminoácidos que compõem a molécula de colágeno. Desta maneira, é possível haver uma interação positiva entre Lys e Arg na síntese de colágeno, seja pela participação da Arg que estimula a secreção do GH e IGF, ou como precursor da síntese de prolina, quando é degradada à ornitina e uréia pela arginase renal (Meijer, *et al.*, 1990; Wu & Morris, 1998).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do antagonismo entre Arg e Lys sobre o desempenho produtivo e a morfometria da pele de frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Aviário da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR. Todos procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, tendo em vista que a metodologia utilizada atende aos princípios éticos na experimentação animal, conforme preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Parecer 009/2006).

Foram utilizados 1.760 pintos de corte, machos, Cobb, provenientes de matrizes de 41 semanas de idade. As aves foram alojadas num galpão convencional de 30 metros de comprimento por oito metros de largura, dividido em boxes de 6,3 m<sup>2</sup>, com cobertura de telha francesa e lanternim, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado. Foi utilizada cama do tipo casca de arroz sobre o piso.

Durante os primeiros dias, foram utilizados comedouros, tipo bandeja de 0,50 m x 0,40 x 0,05 m e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos, gradativamente pelo comedouro tubular e bebedouro automático pendular. A ração e água foram fornecidas 'ad libitum' durante todo o período experimental.

O aquecimento inicial dos pintos foi utilizado lâmpadas infravermelhas, dispostas no centro do círculo de proteção. Foi utilizado um programa de iluminação contínua, durante a primeira semana de 20 h de luz e quatro de escuridão diárias, até o abate.

As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas, diariamente, dentro do galpão, foram, respectivamente, de 18°C e 26°C e a umidade relativa média de 49%. O monitoramento da temperatura e umidade do ar foi procedido por meio de um termohigrógrafo (Isuzu Seisakusho Co. Ltda).

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado de acordo com um arranjo fatorial quatro x quatro (quatro níveis de Lys e quatro níveis de Arg), totalizando 16 tratamentos com duas repetições e 55 aves por unidade experimental.

Foi adotado um programa nutricional de duas fases, uma inicial (1 a 21 dias) e outra de crescimento e final (22 a 42 dias). Essas dietas, à base de milho, farelo de soja e glúten de milho, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais propostas por Rostagno *et al.* (2000). A partir da ração basal da fase inicial, foram compostas as rações experimentais pela suplementação de HCL-Lys e L-Arg, constituídas por quatro níveis de Lys (100%, 120%, 140% e 160% do nível estabelecido na ração basal) correspondentes a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível combinados com quatro níveis de Arg (100%, 120%, 140% e 160% do nível estabelecido na ração basal) correspondentes a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível (Tabela 01). A partir dos 22 dias de idade, todas as aves passaram a receber ração convencional para a fase de crescimento, com 19% de PB, 3150 kcal/kg, 1,073% de Lys e 1,127% de Arg.

A composição química das dietas experimentais foi determinada pela metodologia descrita por Silva (1990) (Tabela 1) e o conteúdo de aminoácidos foi determinado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias)

Níveis de Lys, %	1,189				1,427				1,665				1,902			
	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814
<b>Ingredientes (%)</b>																
Milho	61,54	61,05	60,52	60,08	60,95	60,46	59,97	59,49	60,36	59,87	59,38	58,90	59,77	59,28	58,80	58,31
Glúten Milho	7,37	7,43	7,49	7,54	7,44	7,49	7,55	7,61	7,51	7,56	7,62	7,67	7,57	7,63	7,69	7,74
Óleo Soja	1,41	1,57	1,74	1,89	1,61	1,76	1,92	2,08	1,80	1,95	2,11	2,27	1,99	2,14	2,30	2,46
Soja Farelo 45%	25,29	25,31	25,33	25,35	25,32	25,34	25,35	25,37	25,34	25,36	25,38	25,39	25,36	25,38	25,40	25,42
Sal comum	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Bicarb. de Sódio	0,49	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,51	0,50	0,50	0,51	0,51
Calcário 38%	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91
Fosfato bic. 18%	1,88	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89
DL-Met 98%	0,20	0,20	0,22	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
L-Lys 78%	0,47	0,47	0,47	0,47	0,77	0,77	0,77	0,77	1,08	1,08	1,08	1,08	1,38	1,38	1,38	1,38
L-Tre 98%	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
L-Arg 99%	0,10	0,35	0,61	0,86	0,10	0,35	0,61	0,86	0,10	0,35	0,61	0,86	0,10	0,35	0,61	0,86
Premix <sup>1,2</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>Valores calculados</b>																
Proteína, %	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14
Cálcio, %	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900
Fósforo Disp. %	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
EM kcal/kg	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050
Met+Cist Dig. %	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844
Lys Dig. %	1,189	1,189	1,189	1,189	1,427	1,427	1,427	1,427	1,615	1,615	1,615	1,615	1,902	1,902	1,902	1,902
Tre Dig. %	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773
Arg Dig. %	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814
Sódio %	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218
Potássio %	0,664	0,663	0,662	0,661	0,663	0,662	0,661	0,660	0,662	0,661	0,66	0,659	0,661	0,66	0,659	0,658
Cloro %	0,188	0,187	0,186	0,185	0,242	0,241	0,240	0,239	0,296	0,295	0,294	0,293	0,349	0,348	0,347	0,346

<sup>1</sup>Mistura Vitamínica (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg; Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

<sup>2</sup>Mistura mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

Ao final dos 7, 21 e 42 dias, todas aves de cada unidade experimental e as sobras de ração foram pesadas para a determinação do ganho de peso corporal, consumo de ração e conversão alimentar.

A mortalidade e as causas, determinadas por necropsia, foram registradas e as aves mortas e as sobras de ração do box ao qual pertenciam, foram pesadas ao mesmo tempo, para ajustar o consumo de alimento e a conversão alimentar.

Aos 42 dias de idade, quatro aves por unidade experimental (oito aves/tratamento) foram sacrificadas por deslocamento cervical. Após o sacrifício, foram retiradas amostras de pele de cerca de 2 cm x 1 cm da região dorsal da sobrecoxa esquerda das aves. Essas amostras foram aderidas em papel cartão e imediatamente fixadas em solução de Bouin por 24h e transferidas para solução de álcool a 70%. As peças foram inclusas em parafina e levadas ao micrótomo rotativo para a realização dos cortes longitudinais com cinco micrômetros de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE). A captura de imagens para análise morfológica foi realizada por meio de câmera digital de alta resolução PRO SERIES da Mídia Cibertecnics, acoplada ao microscópio Olympus Bx 40. Para a leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 5.2, da Mídia Cibertecnics.

A epiderme e a derme foram medidas em 20 diferentes locais em cada amostra. A seguir, para cada corte, foi calculada uma média das medidas da espessura da epiderme e da derme, utilizada então para obtenção da média de cada repetição.

Os dados foram analisados, segundo o modelo de superfície de resposta, utilizando o Software SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 1997).

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ijk} = b_0 + b_1L_i + b_2A_j + b_3L_i^2 + b_4A_j^2 + b_5L_iA_j + e_{ijk}$$

em que:

$Y_{ijk}$ : observação da variável dependente na unidade experimental k submetida ao nível i de Lys,  $i = 1,2,3,4$  ( $1 = 1,189\%$ ;  $2 = 1,427\%$ ;  $3 = 1,665\%$ ;  $4 = 1,902\%$ ) e ao nível j de Arg,  $j = 1,2,3,4$  ( $1 = 1,217\%$ ;  $2 = 1,416\%$ ;  $3 = 1,615\%$ ;  $4 = 1,814\%$ );

$b_0$ : constante;

$b_1$  e  $b_2$ : coeficientes lineares de regressão da variável dependente em função dos níveis de Lys e Arg, respectivamente;

$b_3$  e  $b_4$ : coeficientes quadráticos de regressão da variável dependente em função dos níveis de Lys e Arg, respectivamente;

$b_5$ : é o coeficiente de regressão referente ao efeito de interação linear entre os níveis de Lys e Arg;

$e_{ijk}$ : é o erro aleatório associado a cada observação  $y_{ijk}$

Os dados referentes à mortalidade não apresentaram distribuição normal, para a análise, foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972) admitindo-se distribuição binomial com função de ligação 'logit'.

Os coeficientes de determinação foram calculados como percentagem da soma de quadrados do modelo em relação à soma de quadrados total.

## Resultados e Discussão

Os resultados referentes à análise de regressão das medidas de desempenho dos frangos de corte alimentados, com dietas suplementadas com diferentes níveis de Lys e Arg, estão representados na Tabelas 2.

O peso vivo das aves, aos 7 dias, apresentou comportamento quadrático ( $p < 0,05$ ) em função da suplementação de Lys e linear negativo em função da suplementação de Arg. De acordo com a equação ajustada, o nível de 1,345% de Lys resultou em maior ganho de peso (Figura 1). Aos 14 dias, não houve efeito ( $p > 0,05$ ) no peso das aves, entretanto, aos 21 dias de idade, houve interação ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de Lys e Arg. De acordo com a equação ajustada, a suplementação de Lys, a partir do nível de 1,531% passa a restaurar o ganho de peso das aves, conforme Arg, é adicionada às dietas experimentais. A depressão do peso das aves, observada com a adição de Lys, somente, é amenizada quando associada com níveis mais elevados de Arg do que testados neste experimento (Figura 3).

Por outro lado, aos 7 dias de idade, o efeito da adição de Lys sobre o consumo de ração foi linear positivo, enquanto que a suplementação de Arg diminuiu o consumo (Figura 1). A avaliação dos resultados do consumo de ração aos 14 e 21 dias apontou comportamento quadrático ( $p < 0,05$ ), em função da suplementação de Lys, e linear negativo, em função dos níveis dietéticos de Arg. De acordo com as equações ajustadas, os maiores consumos foram obtidos com incrementos de 1,502% e 1,372% de Lys, respectivamente (Figuras 2 e 3).

A conversão alimentar não foi influenciada ( $p > 0,05$ ) aos 7 dias. Todavia, aos 14 dias de idade, apresentou trajetória linear de acordo com a adição de ambos os

aminoácidos. O aumento dos níveis de Lys piorou a conversão alimentar, enquanto foi observado efeito oposto dos incrementos de Arg (Figura 2).

Aos 21 dias, houve interação ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de Lys e de Arg para conversão alimentar. A adição de níveis crescentes de Lys afetou negativamente a conversão, enquanto a adição de Arg melhorou o índice. De acordo com a equação, a combinação entre o menor nível de Lys e o nível de 1,580% de Arg resulta na melhor eficiência de utilização da ração (Figura 3).

Tabela 2. Análise de regressão dos parâmetros de desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Efeito dos níveis*	Parâmetros de desempenho		
	Peso vivo, g	Consumo de ração, g/ave	Conversão alimentar, g/g
		1 a 7 dias	
Lys	quadrático	linear	NS
Arg	linear	linear	NS
Interação	NS	NS	NS
CV (%)	4,41	5,88	6,34
		1 a 14 dias	
Lys	NS	quadrático	linear
Arg	NS	linear	linear
Interação	NS	NS	NS
CV (%)	5,04	5,76	3,01
		1 a 21 dias	
Lys	quadrático	quadrático	linear
Arg	linear	linear	quadrático
Interação	**	NS	**
CV (%)	6,00	5,88	2,34
		1 a 42 dias	
Lys	quadrático	quadrático	linear
Arg	linear	linear	linear
Interação	NS	NS	NS
CV (%)	4,60	4,34	2,12

\* Correspondem a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível.

\*\* significativa ( $p < 0,05$ ).

CV: coeficiente de variação; NS= não significativo ( $p > 0,05$ )

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura, em que foi observado efeito negativo da adição crescente de ambos os aminoácidos, acima das recomendações dos manuais e dos níveis praticados pelas empresas de integração e pela indústria brasileira de ração (NRC, 1994; Lima, 1996; Rostagno *et al.*, 2000). Entretanto, os níveis de Lys para o melhor peso vivo aos 7 dias, foram em torno de 36% mais elevados que as recomendações destes trabalhos, mas coincidentes com valores

das exigências nutricionais indicados nas tabelas Rostagno *et al.* (2005) para a 1ª semana.

Níveis excessivos de aminoácidos apresentaram o pior resultado para ganho de peso e consumo de ração, provavelmente em consequência do desequilíbrio de aminoácidos na dieta, além do maior gasto energético para sua biotransformação e eliminação.

Este custo é relativamente alto, considerando que, para incorporar um aminoácido na cadeia protéica, estima-se em torno de quatro moles de ATP e para excretar cada N do aminoácido são gastos seis moles de ATP (Leclercq, 1996 citado por Costa *et al.*, 2001b). Neste sentido, a Arg por ser o aminoácido com maior número de moléculas de nitrogênio em sua estrutura, é o que mais depende energia no processo de degradação (Leeson & Summers, 2001), ou seja, para catabolizar a Arg (4 N) são gastos 24 ATP. Para as aves, o custo é ainda maior. O gasto para excretar ácido úrico é estimado em quase duas vezes mais do que utilizado na excreção de uréia (Mapes & Krebs, 1978 citados por Klasing, 1998). Além disso, toda vez que uma molécula de ácido úrico é excretada, uma molécula de glicina é eliminada. Este raciocínio tem levado os pesquisadores a acreditar que a exigência de glicina pode ser maior em aves de rápido crescimento e em dietas com excesso de proteína ou desequilíbrio aminoacídico.

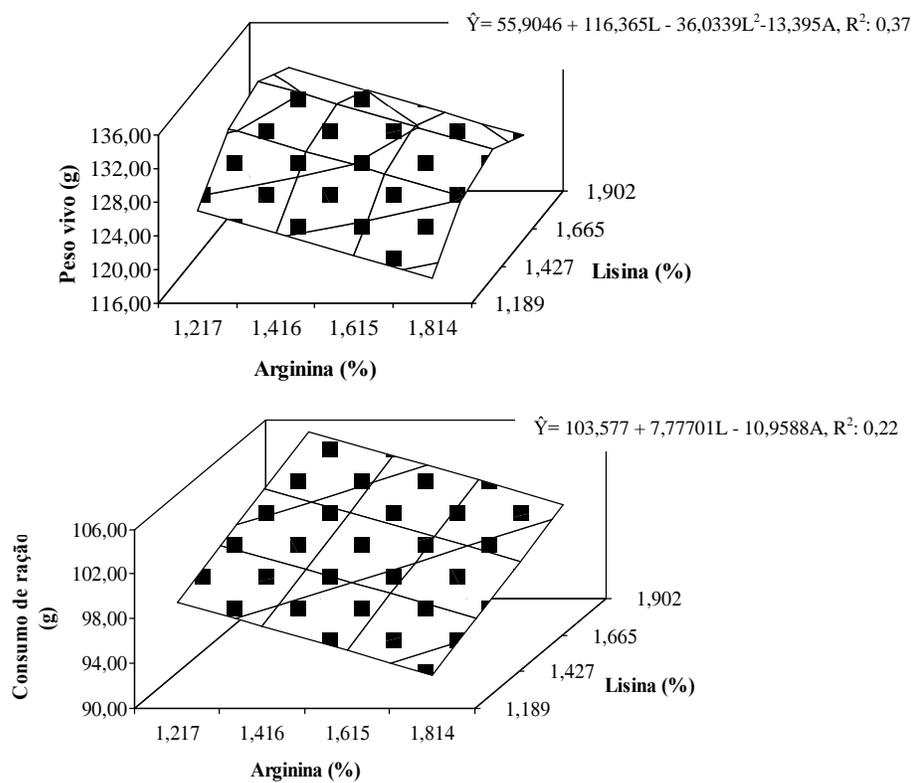


Figura 1. Peso vivo e consumo de ração de frangos de corte no período de 1 a 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Além disso, há outro fato que não pode ser negligenciado. A Arg é condensada com glicina e então metilada, para formar creatina, considerada componente essencial do metabolismo energético no músculo (Keshavarz & Fuller, 1971, Rawson & Clarkson, 2003). Embora a glicina seja sintetizada pelas aves, essa síntese pode não ser suficientemente rápida para satisfazer as necessidades dos tecidos e eliminar todo excesso de nitrogênio (Rostagno *et al.*, 2006). Nestas condições, metionina pode ser o aminoácido limitante, visto o envolvimento na reação de metilação.

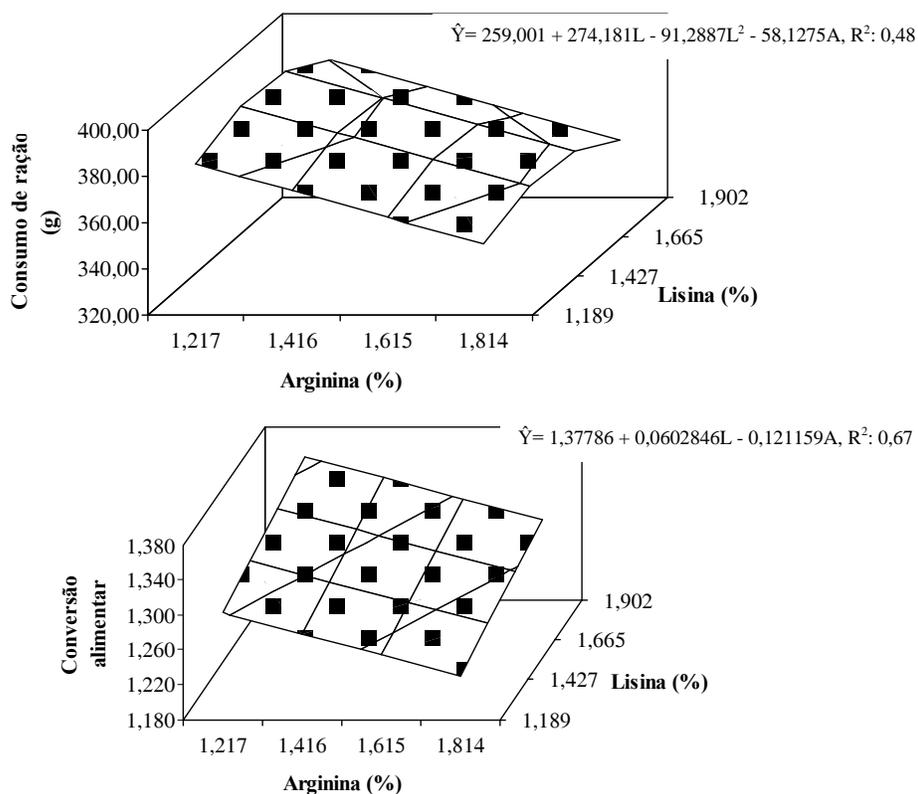


Figura 2. Consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 14 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

O efeito negativo da suplementação de Arg, observado aos sete dias, pode estar associado à incapacidade funcional dos rins em eliminar o excesso de uréia formado pela degradação da Arg. Níveis elevados de Arg *upregulate* a atividade da arginase renal produzindo ornitina e uréia (Stuz *et al.*, 1971), o que pode comprometer a síntese de NO, sendo que a Arg é a única via fisiológica de produção deste composto. Adicionalmente, a elevação da uréia plasmática, de acordo com Prabhakar *et al.*, (1997), pode inibir a ação da NOS, enzima que cataliza a reação que converte Arg em NO. O NO além de neurotransmissor, também, modula a liberação de outros

neurotransmissores (Estrada & Murillo-Carretero, 2005), cujo envolvimento destas moléculas na regulação do apetite vem sendo discutido (Choi *et al.*, 1994; Denbow, 1999). Este mecanismo pode estar contribuindo com o baixo consumo de ração associado à suplementação de Arg, observado no presente trabalho.

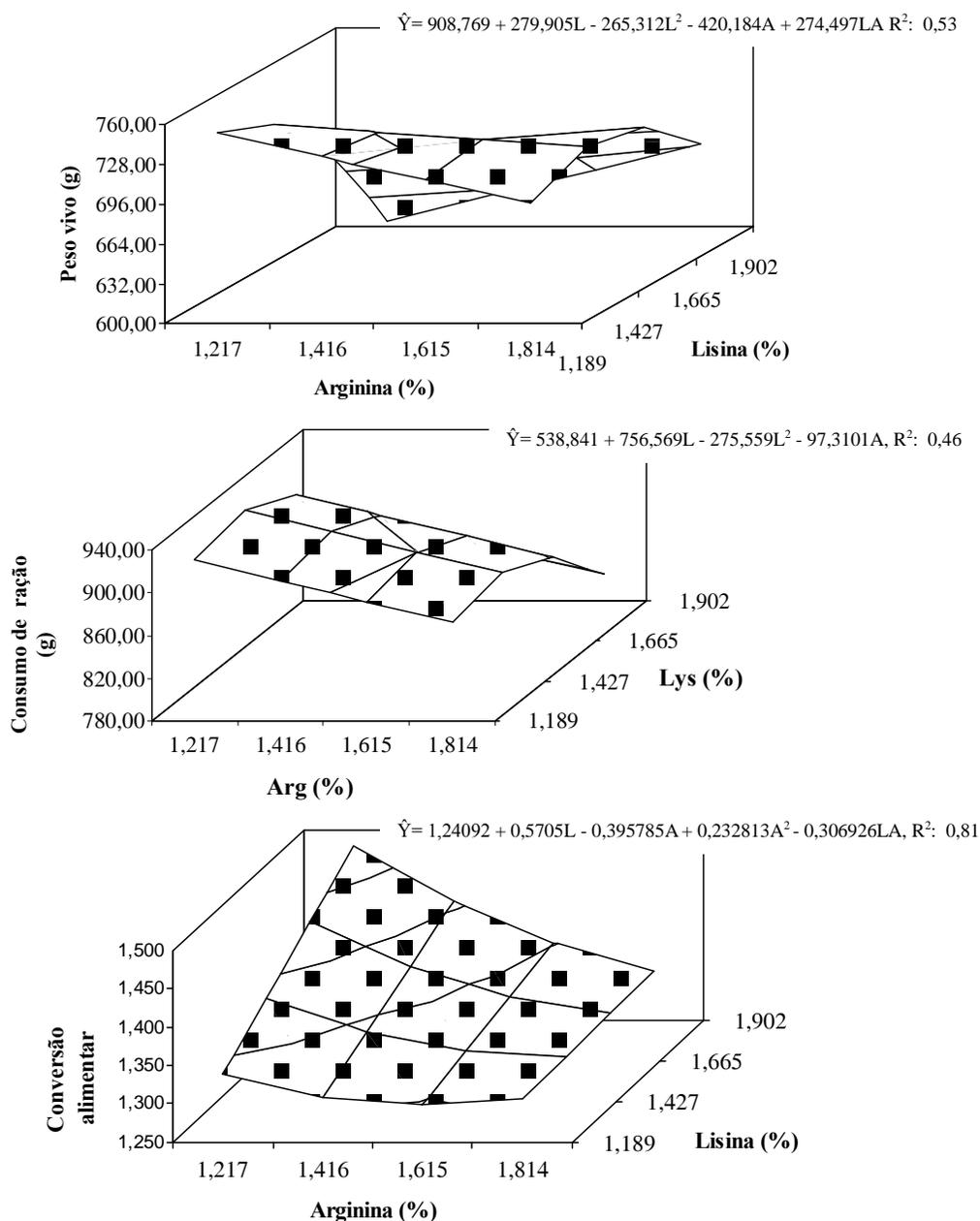


Figura 3. Peso vivo, consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Por outro lado, a suplementação de Lys aumentou o consumo de ração, entretanto, deveria ter desencadeado o mesmo mecanismo, uma vez que a atividade da

arginase renal é também marcadamente aumentada pelo excesso de Lys na dieta (Jones et al, 1967). Chamrupollert *et al.* (2002) observaram uma elevação na atividade da arginase renal pelo aumento de 45 para 77 $\mu$ mol de uréia/h/mg de proteína quando o nível de Lys, na dieta inicial de frangos de corte, passou de 1,26% para 1,86%.

Apesar disso, Ball et al (2007) argumentam que a ativação da arginase renal pela Lys não é imediata. O aumento plasmático desta enzima não é detectado antes de 2 a 4 dias, após a ingestão de uma dieta rica em Lys, apesar da diminuição significativa do nível plasmático de Arg dentro de 6 h após a administração da dieta. Estas ponderações demonstram claramente que a relação destes aminoácidos no metabolismo das aves ainda precisa ser melhor esclarecida.

Os resultados obtidos aos 21 dias mostraram de forma mais evidente o antagonismo entre Lys e Arg. A interação entre os aminoácidos mostrou que o efeito da adição de Lys, no desempenho produtivo dos frangos, foi dependente do nível de Arg. O aumento dos níveis de Lys, no menor nível de Arg, causou depressão do ganho de peso e piora da conversão alimentar. Entretanto, quando os níveis de Arg foram aumentados pelo ajuste da curva, os efeitos depressivos desapareceram. Isto demonstra que o efeito de sobrecarga de Lys, no frango, pode ser equilibrado com Arg, o que implica em dietas com relação arg:Lys mais altas para o máximo desempenho dos frangos de corte. Resultados semelhantes foram obtidos por Gadelha (2004) com incrementos dietéticos de cinco níveis de Lys digestível (0,98; 1,23; 1,47; 1,72 e 1,96%) e dois níveis de Arg digestível (1,30 e 2,06%), na fase de 1 a 21 dias.

Os efeitos deletérios sobre o crescimento das aves foram mais pronunciados com um excesso de Lys (baixa relação Arg:Lys) do que com excesso de Arg (alta relação Arg:Lys), o que está de acordo com Balnave & Brake (2002) ao constatarem o mesmo comportamento do antagonismo entre Arg e Lys nas atuais linhagens comerciais, comparado àquelas utilizadas nos estudos das décadas de 60 e 70.

Apesar de o consumo de ração ser o parâmetro de desempenho mais afetado pelo antagonismo (Austic & Scott, 1975; Calvert *et al.*, 1982) não foi observada interação entre Lys e Arg aos 21 dias, a exemplo do observado para peso vivo e conversão alimentar. É possível que este resultado se explique pelo grau de excesso dos aminoácidos utilizados. A elevação da concentração de aminoácidos pode alterar o perfil aminoacídico plasmático no sangue e induzir, em nível de sistema nervoso central, uma redução no consumo de ração (Buttery & D'Mello, 1994).

Apesar de a Arg restringir o consumo de ração e o ganho de peso, houve melhor conversão alimentar à medida que foi adicionada às dietas. Pode-se inferir que o ganho de peso não foi afetado de forma tão severa quanto o consumo de ração, uma vez que não houve perda na eficiência de utilização do alimento.

De acordo com Buttery & D'Mello (1994), o excesso de aminoácidos que chega ao fígado pela circulação portal é em grande parte retida, mas, apesar da redução, no fornecimento de aminoácidos para os tecidos, a síntese protéica continua ocorrendo, e o que ficou retido pode ser catabolizado. O grupo amino e o nitrogênio adicional dos demais átomos são removidos (Sklan & Noy, 2004) e o esqueleto carbônico resultante é transformado em intermediários das principais vias metabólicas para obtenção de energia (Stryer, 1988). A Arg é um aminoácido gliconeogênico, e, a prioridade de uso para fornecimento de energia, síntese protéica ou de outros compostos não é bem definida. Segundo Baker (2005), a questão da prioridade para síntese funcional é uma área da nutrição ainda não totalmente compreendida para muitos aminoácidos que têm importantes funções precursoras: a Arg, para a síntese protéica, síntese de creatina, óxido nítrico, prolina e poliaminas; a tirosina para a síntese de proteína, catecolaminas, tirosina e melanina; o triptofano para síntese de proteína, serotonina e niacina e a glicina para síntese de proteína (contráteis e colágeno), creatina e ácido úrico.

Mendes *et al.* (1997) e Brake *et al.* (1998), também, observaram melhor conversão alimentar à medida que a Arg foi adicionada às dietas dos frangos de corte. Labadan *et al.* (2001), igualmente, também, apontaram uma necessidade maior de Arg para conversão alimentar do que para ganho de peso.

Burton & Waldroup (1997) encontraram exigência de Arg total de 1,40% em frangos de corte de 1 a 28 dias de idade, recebendo dieta com 1,26% de Lys e 21% de proteína bruta. Por outro lado, Chamruspollert *et al.* (2001), citados por Atencio *et al.* (2004), registraram exigência de Arg total de 1,26%, para ganho de peso, e de 1,27%, para conversão alimentar, utilizando pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. Labadan *et al.* (2001) encontraram exigências de Arg total para as duas primeiras semanas de vida de 1,24 e 1,28%, respectivamente, para ganho de peso e conversão alimentar, valores inferiores aos de Arg total (1,31%), obtidos para ganho de peso e conversão alimentar (1,32%) observados por Atencio *et al.* (2004).

Costa *et al.* (2001a), no entanto, variaram os níveis de Lys na ração (1,03; 1,09; 1,15; 1,21; 1,27 e 1,33% de Lys total) que influenciaram de forma quadrática o ganho de peso e a conversão alimentar das aves. Rezaei *et al.* (2004) utilizaram dietas

suplementadas com Lys (1,0; 1,1 e 1,2%) e observaram aumento do consumo de ração e do peso vivo de frangos de corte machos aos 21 dias de idade.

A utilização de níveis dietéticos de Lys e Arg, na ração de frangos de corte na fase inicial (1 a 21 dias), influenciou o desempenho das aves nas fases de crescimento (22 a 42 dias) apesar de receberem uma dieta basal. Foi observado aumento na taxa de mortalidade na fase posterior àquela suplementada. Durante a fase inicial, a taxa foi mínima (1,5%) e não foi influenciada ( $p>0,05$ ) pelos níveis dietéticos de Lys e Arg. Entretanto, considerando-se a fase de crescimento, houve aumento ( $p<0,05$ ) da taxa de mortalidade de 1,5% para 9,5%, cujo comportamento foi quadrático descendente em função da adição de Lys e ascendente em função da suplementação de Arg (Figura 04).

Esse efeito retardado não tem uma explicação clara. A suplementação de Arg, em níveis recomendados ou muito acima na fase inicial, resultou em maior taxa de mortalidade na fase de crescimento e final, enquanto que níveis de Lys, em torno de 30% acima do recomendado, foram associados com as menores taxas de mortalidade (Figura 4). Pode ser especulado efeito cumulativo dos aminoácidos no metabolismo hepático das aves pelo excesso de nitrogênio proveniente da degradação dos aminoácidos.

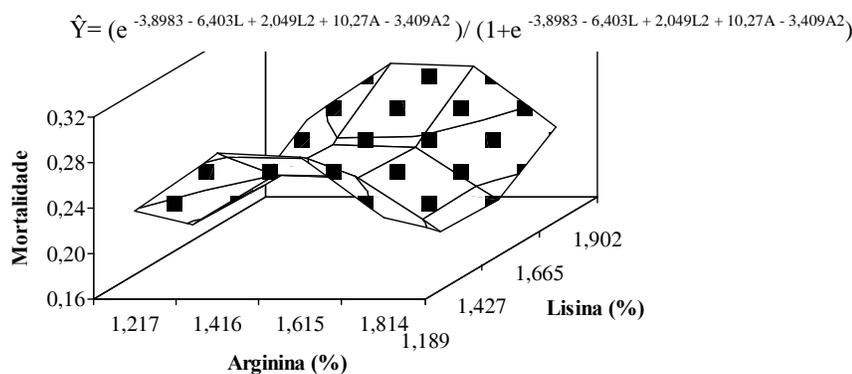


Figura 4. Valores corrigidos de mortalidade de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

O peso vivo e o consumo de ração na idade de abate foram afetados de forma semelhante. Foi observado comportamento quadrático destas variáveis com os valores máximos no nível de 1,465 e 1,514% de Lys, e linear negativo pela inclusão de Arg na dieta da fase inicial. Por outro lado, a conversão alimentar apresentou o mesmo comportamento observado durante a fase inicial, o aumento dos níveis de Lys piorou a conversão alimentar, enquanto foi observado efeito oposto dos incrementos de Arg (Figura 5).

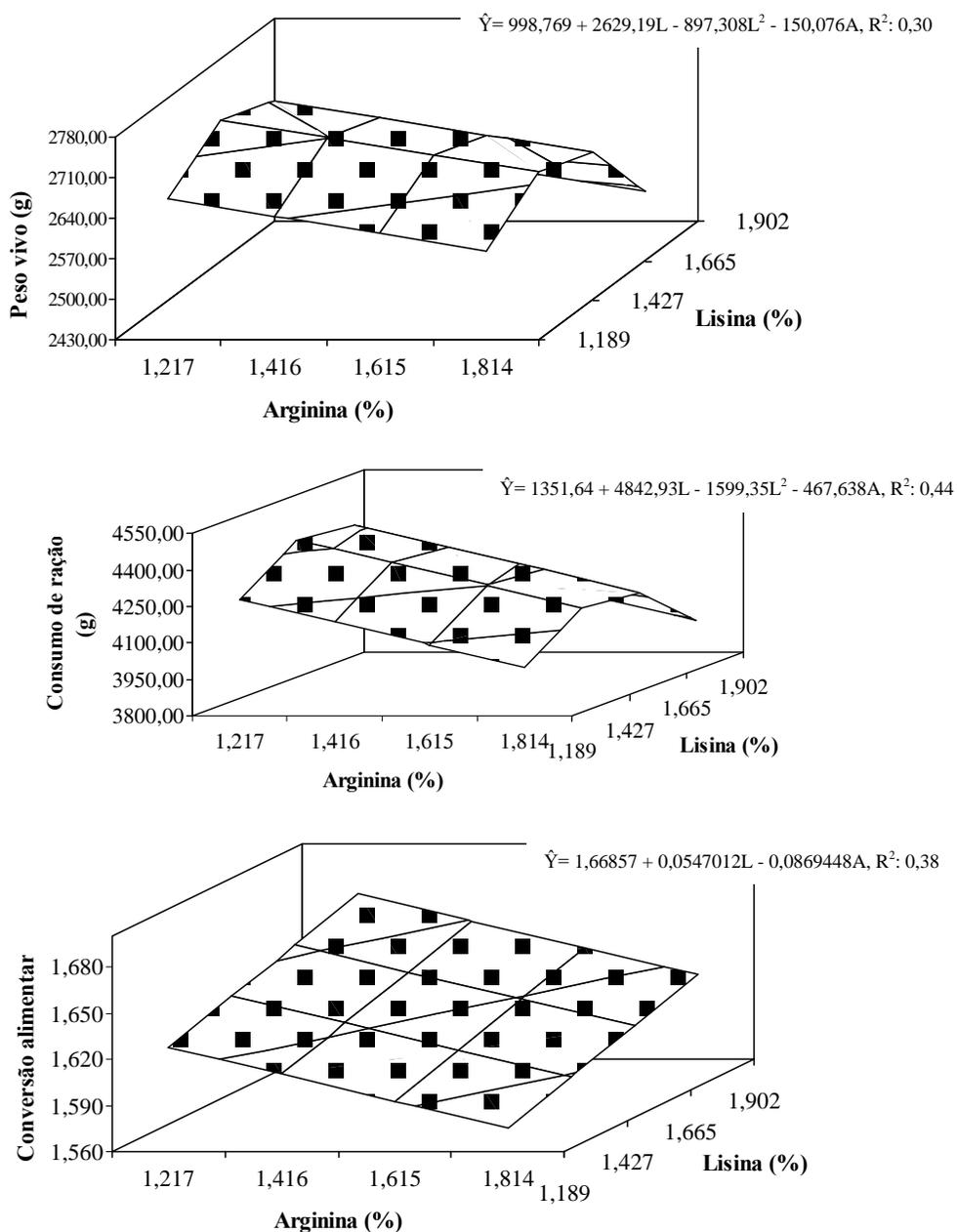


Figura 5. Peso vivo, consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Costa *et al.* (2001b), utilizando frangos de corte de 22 a 42 dias de idade e sete relações Arg:Lys, variando de 95 a 132,5%, mantendo fixo o nível de Lys, não observaram efeito do nível de Arg sobre as características de desempenho. No presente trabalho, apesar disso, foi observado efeito negativo da adição de Arg na ração inicial. Além dos níveis de Arg utilizados por estes autores variarem de deficientes a um pouco acima do recomendado, as aves passaram a receber a dieta apenas aos 22 dias com suplementação até os 42 dias, diferentemente do presente trabalho.

Por outro lado, a suplementação de Lys influenciou o peso das aves de forma quadrática à semelhança dos resultados obtidos por Valerio *et al.* (2003), e Amarante Jr. *et al.* (2005). O consumo de ração descreveu o mesmo comportamento, que discorda com estes autores, ou seja, não observaram efeito deste parâmetro, mas corrobora com os obtidos por Conhalato *et al.* (1999) que relataram o mesmo comportamento. É importante ponderar que, também nestes experimentos, os níveis de Lys usados foram menores e suplementados dos 21 aos 42 dias.

É importante ainda considerar que, ao alterar os níveis de suplementação de Lys das rações, para testar somente seu efeito no desempenho animal, altera-se também a relação aminoacídica destas rações, criando, desta maneira, mais uma fonte de variação, que podem ter influenciado os resultados obtidos.

Os resultados referentes à análise de regressão dos parâmetros das medidas morfométricas das camadas da pele (epiderme e derme) estão representados na Tabela 3. A análise morfométrica das camadas da pele, epiderme e derme dos frangos de corte aos 42 dias de idade apresentou efeito ( $p < 0,05$ ) apenas para a medida da derme, apesar da suplementação de Lys e Arg ter sido limitada à dieta inicial das aves. Houve interação ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de Lys e Arg, o que levou ao aumento linear da espessura da derme de acordo com a suplementação de ambos os aminoácidos (Figura 6).

Tabela 3. Análise de regressão das medidas morfométricas das camadas da pele (epiderme e derme) de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Efeito dos níveis*	Camadas da pele		
	Espessura da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	Espessura da derme ( $\mu\text{m}$ )	Espessura da epiderme + derme ( $\mu\text{m}$ )
Lys	NS	linear	NS
Arg	NS	linear	NS
Interação	NS	**	NS
CV (%)	6,15	10,69	10,10

\* Correspondem a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível.

\*\* significativa ( $p < 0,05$ ).

CV: coeficiente de variação; NS= não significativo ( $p > 0,05$ )

A derme é a principal camada da pele e, embora também apresente diversos tipos de células, é muito mais fibrosa que celular; seus mais importantes constituintes são as fibras colágenas e elásticas. As fibras colágenas, por sua vez, se constituem no principal fator responsável pela resistência da pele.

Esse efeito positivo, na espessura da pele, reveste-se de importância pelo fato das atuais linhagens de corte apresentarem expressiva velocidade de crescimento, associada com a criação em alta densidade, tornando-as predispostas aos arranhões e

escoriações na pele. Além disso, estas aves têm problemas de empenamento, deixando dessa forma, áreas do corpo pouco cobertas e assim desprotegidas. Esse quadro pode ser agravado ainda mais, se a linhagem é de baixa velocidade de empenamento.

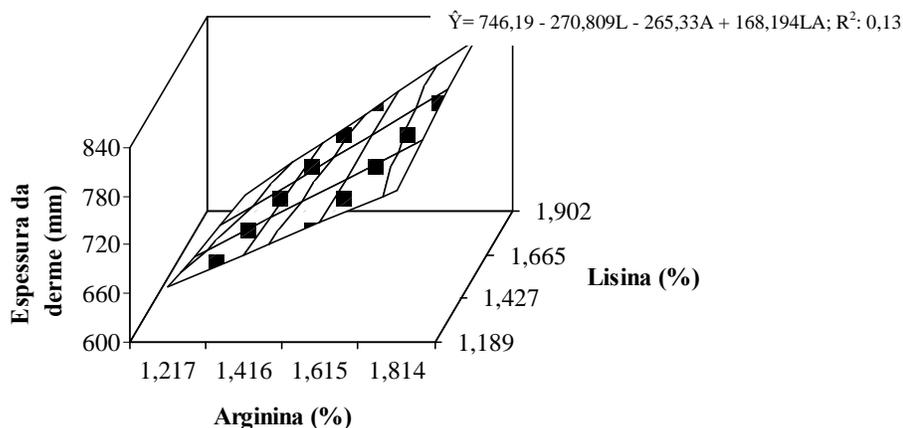


Figura 6. Espessura da derme de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

As condenações por problemas de qualidade das carcaças provocam enormes perdas no setor de produção avícola em todos os países. Estudos realizados, nos EUA, mostram que cerca de 7% das carcaças são desclassificadas por causa das lesões cutâneas (Mendes, 2001).

Essa interação positiva observada, entre Lys e Arg na medida da espessura da derme, pode ser atribuída a ‘upregulation’ da arginase renal pela Lys, levando à degradação de Arg para a síntese de ornitina que por sua vez gera prolina (Meijer, *et al.*, 1990; Wu & Morris, 1998). Como as aves não podem sintetizar ornitina, praticamente toda ornitina plasmática é derivada do metabolismo da Arg (Nesheim *et al.*, 1968; Austic & Nesheim, 1971; Stutz *et al.*, 1971; Chu & Nesheim, 1979). Lys e prolina, após hidroxilação, são convertidas para hidroxilLys e hidroxiprolina, aminoácidos necessários para a estrutura e função do colágeno.

Por outro lado, a maior deposição de colágeno associada ao aumento da espessura da derme também pode ser em decorrência da ação estimulatória sobre os níveis de GH e IGF. Biondo-Simões *et al.* (2000) demonstraram que a aplicação de GH, em ratos, levou a maior concentração de colágeno e acelerou a maturação das cicatrizes. Estudo ‘in vitro’ de Conconi *et al.* (2001), com cultura de osteoblastos enriquecida com Arg e Lys, produziram níveis significativamente aumentados de colágeno.

## Conclusão

O desempenho produtivo dos frangos de corte respondeu positivamente aos incrementos dietéticos de Lys próximos das atuais recomendações, entretanto, níveis mais elevados prejudicaram o crescimento das aves pela relação antagônica com a Arg. Estes resultados permitem inferir que os efeitos deletérios sobre o crescimento das atuais linhagens comerciais foram mais evidentes com excesso de Lys (baixa relação Arg:Lys) do que com excesso de Arg (alta relação Arg:Lys).

A espessura da derme da pele dos frangos de corte na idade de abate aumentou com a suplementação de Arg e Lys na dieta da fase inicial.

## Referências

Amarante Jr VS, Costa FGP, Barros LC, Nascimento GAJ, Brandão PA, Silva JHV, Pereira WE, Nunes RV, Costa JS, Ribeiro MLG. Níveis de Lisina para frangos de corte nos períodos de 22 a 42 e de 43 a 49 dias de idade, mantendo a relação metionina + cistina. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2005; 34(4):1188-94.

Atencio A, Albino LFT, Rostagno HS, Oliveira DC, Vieites FM, Pupa JMR. Exigência de arginina digestível para frangos de corte machos em diferentes fases. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2004; 33(6):1456-66.

Austic RE, Nesheim MC. Arginine, ornithine and proline metabolism of chicks: Influence of diet and heredity. *Journal of Nutrition* 1971; 101(10):1403-13.

Austic RE, Scott RL. Involvement of food intake in the Lisinaine-arginine antagonism in chicks. *Journal of Nutrition* 1975; 105(9):1122-31.

Baker DH. Comparative nutrition and metabolism: Explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(50):17897-902.

Ball RO, Urschel KL, Pencharz PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and Lisinaine metabolism. *Journal of Nutrition* 2007; 137(6):1626-41.

Biondo-Simões MLP, Pante ML, Macedo VL, Garcia RF, Boell P, Moraes THC. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2000; 15(3):78-82.

Brake J, Balnave D, Dibner JJ. Optimum dietary arginine:Lisine ratio for broiler chickens is altered during heat stress in association with changes in intestinal uptake and dietary sodium chloride. *British Poultry Science* 1998; 39(2):639-47.

Burton EM, Waldroup P. Arginine and Lysine needs of young broiler chicks. *Nutrition International* 1997; 19(4):607-14.

Buttery PJ, D'Mello JPF. Amino Acid Metabolism in Farm Animals: An Overview. In: D'mello JPF, editor. *Amino Acids in Farm Animal Nutrition*. Wallingford (UK): CAB International; 1994. p. 1-10.

Calvert CC, Klasing KC, Austic RE. Involvement of food intake and amino acid catabolism in the branched-chain amino acid antagonism in chicks. *Journal of Nutritional* 1982; 112(4):627-29.

Chamruspollert M, Pesti GM, Bakalli RI. Dietary interrelationships among arginine, methionine, and Lysine in young broiler chicks. *British Journal of Nutrition* 2002; 88:655-60.

Choi YH, Furuse M, Okomura JI, Denbow DM. Nitric oxide controls feeding behavior in the chicken. *Brain Research* 1994; 654:163-6.

Chu SW, Nesheim MC. The Relationship of Plasma Arginine and Kidney Arginase Activity to Arginine Degradation in Chickens. *Journal of Nutrition* 1979; 109(10):1752-8.

Conhalato GS, Donzele JL, Albino LFT. Níveis de lisina digestível para frangos de corte machos na fase de 21 a 42 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 1999; 28(1):91-97.

Costa FGP, Rostagno HS, Albino LFT. Níveis de lisina digestível para frangos de corte machos na fase de 21 a 42 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001a; 30(5):1490-7.

Costa FGP, Rostagno HS, Toledo, RS, Albino LFT. Efeito da relação arginina:lisina sobre o desempenho e qualidade de carcaça de frangos de corte de 3 a 6 semanas de idade, em condições de alta temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001b; 30(6):2021-25.

Czarnecki GL, Hirakawa DA, Baker DH. Antagonism of arginine by excess dietary Lysine in the growing dog. *Journal of Nutrition* 1985; 115(6):743-52.

Denbow DM. Food intake regulation in birds. *Journal of Experimental Zoology* 1999; 283:333-8.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39:343-50.

Edmonds MS, Baker DH. Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick. *Journal of Animal Science* 1987; 65(3):699-705.

Estrada C, Murillo-Carretero M. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 2005; 11(4):294-307.

Gadelha, AC. Resposta produtiva, imune e desenvolvimento ósseo de frangos de corte alimentados com diferentes relações de arginina e lisina digestíveis. [Tese]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004.

Harper AE, Benevenga NJ, Wohlhueter RM. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological Reviews* 1970; 50(3):428–558.

Kadirvel R, Kratzer FH. Uptake of L-arginine and L-Lysine by the small intestine and its influence on arginine-Lysine antagonism in chicks. *Journal of Nutrition* 1974; 104(3):339–43.

Keshavarz K, Fuller HL, Relationship of arginine and methionine in the nutrition of the chicks and the significance of creatine biosynthesis in their interaction. *Journal of Nutrition* 1971; 101(2):217-22.

Klasing KC. Comparative avian nutrition. Wallingford: Cab International; 1998. p. 136.

Labadan Jr MC, Hsu KN, Austic RE. Lysine and arginine requirements of broiler chickens at two to three weeks intervals to eight weeks of age. *Poultry Science* 2001; 80(5):599-606.

Leeson S, Summers JD. Nutrition of the chicken. 4 ed. Guelph: University Books; 2001.

Lima IL. Níveis nutricionais utilizados nas rações pela indústria avícola. In: Simpósio internacional sobre exigências nutricionais de aves e suínos; 1996; Viçosa, MG. Brasil. p.389-402.

Meijer AJ, Lamers WH, and Chamuleau AFM. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews* 1990; 70(3):701–748.

Mendes AA, Watkins SE, England JA. Influence of dietary Lysine levels and arginine:Lysine ratios on performance of broilers exposed to heat or cold stress during the period of three to six weeks of age. *Poultry Science* 1997; 76(3):472-81.

Mendes AA. Rendimento e qualidade de carcaça de frangos de corte. In: Conferência APINCO 2001 de Ciência e Tecnologia Avícolas; 2001; Campinas, São Paulo. Brasil. p.57-64.

Nesheim MC, Christensen DA, Arnold DL. Arginine deficiency in two strains of chicks selected for differences in dietary requirements of arginine. *Journal of Nutrition* 1968; 92(3): 365.

Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical Science* 2005; 108:185–194.

NRC. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry. 8<sup>th</sup> rev. ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Prabhakar SSG, Zeballos A, Montoya-Zavala M, Leonard C. Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *American Journal of Physiology* 1997; 273(6):1882–8.

Rawson ES, Clarkson PM. Scientifically debatable: Is creatine worth its weight? *Sports Science Exchange* 2003; 16:1-6.

Rezaei M, Moghaddam HN, Reza JP, Kermanshahi H. The effects of dietary protein and Lysine levels on broiler performance, carcass characteristics and n excretion. *International Journal of Poultry Science* 2004; 3(2):148-52.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2000. 141p.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 2 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2005. 185p.

Sklan D, Noy Y. Catabolism and deposition of amino acids in growing chicks: effect of dietary supply. *Poultry Science* 2004; 83(6):952-61.

Stryer, L. Degradação de aminoácidos e ciclo da uréia. In: *Bioquímica*. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1988.

Stutz MW, Savage JE, O'Dell BL. Relation of dietary cations to arginine:lysine antagonism and free amino acid pattern in chicks. *Journal of Nutrition* 1971; 101(3):377-384.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG; sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário. Versão 7.1. Viçosa, 1997. 150p.

Valério SR Oliveira RFM, Donzele JL. Níveis de lisina digestível em rações, mantendo ou não a relação aminoacídica, para frangos de corte de 22 a 42 dias de idade, sob condições de estresse por calor. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2003; 32(2):372-82.

#### **IV - Avaliação do Antagonismo entre Arginina e Lisina na Dieta Inicial sobre os Níveis Plasmáticos de IGF-I e o Desenvolvimento Ósseo de Frangos de Corte**

RESUMO: A finalidade deste estudo foi avaliar o efeito do antagonismo entre arginina (Arg) e lisina (Lys) sobre os níveis plasmáticos do IGF-I e seu reflexo sobre o metabolismo e crescimento ósseo dos frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. Foram utilizados 1.760 pintos de corte, Cobb, machos, os quais foram alocados aleatoriamente de acordo com um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial quatro x quatro (níveis de Lys e Arg) totalizando 16 tratamentos com duas repetições e 55 aves por unidade experimental. As dietas iniciais foram formuladas para conter 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível. A adição de Arg contribuiu ( $p < 0,05$ ) com o aumento do diâmetro, da densidade e da espessura óssea. Entretanto, níveis excessivos de Arg na fase inicial levaram ao aumento ( $p < 0,05$ ) da área hipertrófica da placa de crescimento e da atividade da fosfatase alcalina na idade de abate. Por outro lado, a Lys afetou positivamente ( $p < 0,05$ ) a resistência óssea à quebra, mas também contribuiu negativamente com a ocorrência da discondroplasia tibial. O efeito da Lys sobre o tecido ósseo pode estar relacionado à produção de colágeno como reflexo do aumento ( $p < 0,05$ ) dos níveis plasmáticos de IGF-I pela suplementação de Lys. Arg não alterou IGF-I, provavelmente, por causa da degradação pela Lys, o que inibiu seu papel secretagogo descrito em mamíferos. Os parâmetros ósseos avaliados, no final da fase de crescimento (22 a 42 dias), foram influenciados pela suplementação na dieta inicial.

Palavras-chave: aminoácidos, tibia, resistência óssea à quebra, cartilagem hipertrófica

#### **IV – Evaluation of the antagonism between arginine and lysine in the initial diet on plasma levels of IGF-I and bone metabolism and development of broiler chickens**

**ABSTRACT:** This trial evaluated the antagonism between arginine (Arg) and lysine (Lys) on plasma levels of IGF-I and influence on broiler chickens' bone metabolism and growth. One thousand seven hundred and seventy-six male Cobb broilers were reared in a factorial four x four design (Lys and Arg levels) with two replications of 55 birds each. Experimental diets were formulated to contain 1.189%; 1.427%; 1.665% and 1.902% digestible Lys levels and 1.217%; 1.416%; 1.615% and 1.814% digestible Arg levels. Arg additions increased diameter, density, and total cortical bone thickness. However, extreme levels of Arg in the initial phase increased ( $p < 0.05$ ) the hypertrophic zone cartilage of growth plate and alkaline phosphatase activity on the 42<sup>nd</sup> day. On the other hand, Lys positively affected ( $p < 0.05$ ) the bone's breaking strength and contributed negatively towards tibial dyschondroplasia. Lys's effect on the bone tissue may be related to the production of collagen as reflected in increasing ( $p < 0.05$ ) IGF-I levels determined by Lys supplementation. Arg did not alter IGF-I probably owing to degradation by Lys, which inhibited their secretagogue role in mammals. Bone parameters evaluated at the end of the growth phase (22-42 days) were influenced by the amino acids supplementing the initial diet.

**Key words:** amino acids, tibiotarsus, bone's breaking strength, hypertrophic cartilage

## Introdução

A nutrição e o melhoramento genético avícola têm contribuído para que o frango de corte moderno seja abatido cada vez mais pesado e em um período de tempo cada vez menor. Entretanto, o frango de corte até a idade do abate encontra-se, ainda, em fase de crescimento, seus ossos são relativamente imaturos, e com muito pouco tecido ósseo compacto (Mendonça Jr., 2000).

Estas aves têm, normalmente, pernas curtas com uma grande quantidade de massa muscular. Com isso, o peso do peito move o centro de gravidade cranialmente (Corr *et al.*, 2003). Para compensar estas variações, andam lentamente com os dedos dos pés direcionados para fora e param constantemente, tornando-se cada vez menos ativos (Kestin *et al.*, 2001). O desenvolvimento e a maturidade óssea não acompanham o ritmo do crescimento muscular resultando em alterações fisiológicas e mecânicas no tecido esquelético das aves (Nelson *et al.*, 1992; Lilburn, 1994; Thorp, 1994; Rath *et al.*, 2000; Oviedo & Ferket, 2005).

A incidência e a severidade da maioria das desordens ósseas observadas na avicultura são controladas por fatores genéticos e nutricionais. Estas alterações, além de comprometerem o bem-estar das aves, reduzem o crescimento, aumentam a mortalidade e depreciam o valor comercial das carcaças (Williams *et al.*, 2000).

A fragilidade e a porosidade do osso estão correlacionadas com incidência de fragmentos de ossos em produtos desossados (Gregory & Wilkins, 1992), fator extremamente relevante para a indústria, visto que causam maior proporção de manchas de sangue nos cortes. Além das condenações das carcaças comprometidas, ocorrem perdas de cortes comerciais por problemas de quebra de ossos (Corzo *et al.*, 2003).

A discondroplasia tibial é uma desordem bem reconhecida em frangos de crescimento rápido, atribuída a uma assincronia no processo de diferenciação dos condrócitos, levando à formação de uma camada de condrócitos pré-hipertróficos, resistente à invasão vascular e, conseqüentemente à calcificação (Rath *et al.*, 1998; Edwards Jr., 2000; Praul *et al.*, 2000).

A exemplo dos outros tecidos orgânicos, o crescimento do tecido ósseo é conduzido por dois principais fatores: a expressão genética das proteínas responsáveis pelo desenvolvimento corporal e a suplementação de nutrientes em quantidades adequadas (Almeida Paz & Bruno, 2006).

Segundo Conconi *et al.* (2001), os aminoácidos podem atuar diretamente na formação da matriz óssea e podem também modular o crescimento e a diferenciação de osteoblastos. Os resultados obtidos pela pesquisa conduzida por Silva *et al.* (2001), também sugerem participação dos aminoácidos na síntese da matriz orgânica óssea. Estes autores verificaram comprometimento no desenvolvimento do tecido ósseo de frangos de corte alimentados com dietas deficientes em proteína na fase inicial.

Enquanto a matriz mineral inorgânica representa a rigidez e resistência à compressão, as fibrilas orgânicas do colágeno suportam a tensão e a torção e ambas as propriedades contribuem com a qualidade óssea (Oviedo & Ferket, 2005).

A carência ou o desbalanceamento entre nutrientes pode afetar o crescimento ósseo. Apesar das evidências de que a utilização de níveis elevados de lisina (Lys) proporciona maior crescimento muscular, é preciso considerar o efeito sobre o desenvolvimento ósseo. O antagonismo entre arginina (Arg) e Lys envolve a diminuição da síntese de creatina, aumento da atividade da arginase renal levando à degradação de Arg e ao aumento da excreção de uréia (Austic & Scott, 1975). As aves são dependentes de uma fonte exógena de Arg, uma vez que este aminoácido não é obtido pela via de depuração nitrogenada utilizada pelas aves.

A Arg é requerida para síntese de vários compostos, tais como ornitina, poliaminas, prolina, creatina, síntese de proteínas, óxido nítrico e citrulina, em consequência é o mais alto requerimento entre as espécies animais estudadas (Ball *et al.*, 2007), além da alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais linhagens de corte. Neste sentido, a Arg é considerada um aminoácido essencial para as aves.

Na década de 60, já era conhecida a participação da Arg na secreção do hormônio do crescimento (GH) e dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) (Merimee *et al.*, 1965). O GH pode exercer diretamente seus efeitos nos tecidos, por meio da diferenciação de células precursoras ou suas ações podem ser mediadas por um mecanismo indireto, mediado pelo aumento do IGF-I, que estimula a proliferação celular por mecanismos autócrinos e parácrinos (Isaksson *et al.*, 1987).

Segundo Baylink *et al.* (1993), os efeitos dos aminoácidos essenciais, no tecido ósseo em crescimento, são, provavelmente, mediados pelo IGF-I. Canalis *et al.* (1988) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar que os osteoblastos sintetizam IGF-I, e que este fator do crescimento tem efeito mitogênico em células do tecido ósseo.

Similarmente a outros tecidos, a ação dos fatores do crescimento no osso não é limitada somente à replicação celular, mas também a funções diferenciadas, tais como a produção de colágeno e organização da matriz óssea (Hock *et al.*, 1988).

Chevalley *et al.* (1998) demonstraram que Arg e Lys aumentaram a produção 'in vitro' de IGF-I por osteoblastos mantidos em cultura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de Lys e Arg na dieta inicial sobre o desenvolvimento e metabolismo ósseo de frangos de corte e a influência sobre os níveis plasmáticos de IGF-I

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Aviário da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR. Todos procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, tendo em vista que a metodologia utilizada atende aos princípios éticos na experimentação animal, conforme preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 1.760 pintos de corte, machos, Cobb, provenientes de matrizes de 41 semanas de idade. As aves foram alojadas num galpão convencional de 30 ms de comprimento por 8 ms de largura, dividido em boxes de 6,3 m<sup>2</sup>, com cobertura de telha francesa e lanternim, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado. Foi utilizada cama do tipo casca de arroz sobre o piso.

Durante os primeiros dias, foram utilizados comedouros tipo bandeja de 0,50m x 0,40 x 0,05m e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos, gradativamente, pelo comedouro tubular e bebedouro automático pendular. A ração e água foram fornecidas 'ad libitum' durante todo o período experimental.

O aquecimento inicial dos pintos foi utilizado lâmpadas infravermelhas, dispostas no centro do círculo de proteção. Foi utilizado um programa de iluminação contínua, durante a primeira semana e de 20 h de luz e quatro de escuridão diárias, até o abate.

As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas diariamente dentro do galpão foram, respectivamente, de 18°C e 26°C e a umidade relativa média de 49%. O

monitoramento da temperatura e umidade do ar foi por meio de um termohigrógrafo (Isuzu Seisakusho Co. Ltda).

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado de acordo com um arranjo fatorial quatro x quatro (quatro níveis de Lys e quatro níveis de Arg), totalizando 16 tratamentos com duas repetições e 55 aves por unidade experimental.

Foi adotado um programa nutricional de duas fases, uma inicial (1 a 21 dias) e outra de crescimento e final (22 a 42 dias). Essas dietas, à base de milho, farelo de soja e glúten de milho, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais propostas por Rostagno *et al.* (2000). A partir da ração basal da fase inicial, foram compostas as rações experimentais pela suplementação de HCL-Lys e L-Arg, constituídas por quatro níveis de Lys (100%, 120%, 140% e 160% do nível estabelecido na ração basal) correspondentes a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível combinados com quatro níveis de Arg (100%, 120%, 140% e 160% do nível estabelecido na ração basal) correspondentes a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível (Tabela 1). A partir dos 22 dias de idade, todas as aves passaram a receber uma ração convencional para a fase de crescimento, com 19% de PB, 3150 kcal/kg, 1,073% de Lis e 1,127% de Arg.

A composição química das dietas experimentais foi determinada pela metodologia descrita por Silva (1990) (Tabela 01) e o conteúdo de aminoácidos foi determinado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Aos 7, 21 e 42 dias de idade foram colhidas amostras de sangue de quatro aves por unidade experimental (oito aves/tratamento) para análise de fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase e IGF-I. Uma amostra de 3 ml de sangue foi obtida por punção cardíaca com seringa heparinizada para análise de IGF-I e outra amostra de 3 ml para as demais análises. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm. De cada tubo, foi retirado 1,0 ml de soro ou plasma que foi identificado e armazenado em freezer -20° C.

O método utilizado para determinação de fosfatase alcalina e gama-GT foi o teste colorimétrico cinético da Diasys Diagnostic Systems. A concentração plasmática de IGF-I foi obtida por meio de um radioimunoensaio heterólogo, de acordo com o procedimento descrito por Huybrechts *et al.* (1985), após extração das proteínas ligantes de IGF-I (IGFBP) do plasma.

Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias)

Níveis de Lys, %	1,189				1,427				1,665				1,902			
	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814
<b>Ingredientes (%)</b>																
Milho	61,54	61,05	60,52	60,08	60,95	60,46	59,97	59,49	60,36	59,87	59,38	58,90	59,77	59,28	58,80	58,31
Glúten Milho	7,37	7,43	7,49	7,54	7,44	7,49	7,55	7,61	7,51	7,56	7,62	7,67	7,57	7,63	7,69	7,74
Óleo Soja	1,41	1,57	1,74	1,89	1,61	1,76	1,92	2,08	1,80	1,95	2,11	2,27	1,99	2,14	2,30	2,46
Soja Farelo 45%	25,29	25,31	25,33	25,35	25,32	25,34	25,35	25,37	25,34	25,36	25,38	25,39	25,36	25,38	25,40	25,42
Sal comum	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Bicarb. de Sódio	0,49	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,51	0,50	0,50	0,51	0,51
Calcário 38%	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91
Fosfato bic. 18%	1,88	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89	1,89
DL-Met 98%	0,20	0,20	0,22	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
L-Lys 78%	0,47	0,47	0,47	0,47	0,77	0,77	0,77	0,77	1,08	1,08	1,08	1,08	1,38	1,38	1,38	1,38
L-Tre 98%	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
L-Arg 99%	0,10	0,35	0,61	0,86	0,10	0,35	0,61	0,86	0,10	0,35	0,61	0,86	0,10	0,35	0,61	0,86
Premix <sup>1,2</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>Valores calculados</b>																
Proteína, %	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14	21,14
Cálcio, %	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900
Fósforo Disp. %	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
EM kcal/kg	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050
Met+Cist Dig. %	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844
Lys Dig. %	1,189	1,189	1,189	1,189	1,427	1,427	1,427	1,427	1,615	1,615	1,615	1,615	1,902	1,902	1,902	1,902
Tre Dig. %	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773	0,773
Arg Dig. %	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814	1,217	1,416	1,615	1,814
Sódio %	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218
Potássio %	0,664	0,663	0,662	0,661	0,663	0,662	0,661	0,660	0,662	0,661	0,66	0,659	0,661	0,66	0,659	0,658
Cloro %	0,188	0,187	0,186	0,185	0,242	0,241	0,240	0,239	0,296	0,295	0,294	0,293	0,349	0,348	0,347	0,346

<sup>1</sup>Mistura Vitamínica (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg; Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

<sup>2</sup>Mistura mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

Após a colheita do sangue, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical, após pesadas individualmente e retiradas as pernas. Após remoção de todo tecido aderente da perna esquerda, o fêmur e a tíbia foram pesados, e medidos o comprimento e diâmetro, com auxílio de um paquímetro digital (mm). O índice de Seedor (Seedor *et al.* 1991) foi obtido pela divisão do peso dos ossos (mg) pelo seu comprimento (mm).

As tíbias esquerdas das quatro aves de cada unidade experimental (oito aves/tratamento) foram fervidas por 10 minutos, secas em estufa (48 h, 105°C) e submetidas ao ensaio de flexão à taxa de deformação constante para material visco-elástico, com equipamento de ensaio universal da Marca EMIC, modelo DL 10000, com célula de carga de 500 kgf, velocidade do cabeçote de 2 mm/min e distância de apoio de eixo a eixo de 2 cm para a idade de 7 e 14 dias; 3,2 cm para os 21 dias e 5,5 para os 42 dias de idade.

Na porção medial da diáfise óssea foi medida a espessura do osso cortical, com auxílio de paquímetro digital (mm) na fase lateral adjacente à fibula óssea e na região oposta, fase medial, obtendo-se duas medidas das quais foi calculado o valor médio de espessura do osso cortical.

Os mesmos ossos foram, posteriormente, submetidos à extração de gordura por tratamento sucessivo em éter de petróleo por 8 h, em seguida, secos por 12 h em estufa mantida entre 100 e 103°C, pesados e calcinados em forno mufla a 600°C por 12 h para determinação do teor de cinzas ósseas (AOAC, 1984).

A tíbia direita das quatro aves, por unidade experimental (oito aves/tratamento), foram fixadas em solução de Bouin para análise histológica, segundo processos descritos por Beçak (1976). A descalcificação dos ossos foi realizada com ácido nítrico e fluroglucina (Solução de Haug). As peças foram inclusas em parafina e levadas ao micrótomo rotativo para a realização dos cortes com 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina para observação do desenvolvimento das zonas do disco epifisário. As lâminas foram escaneadas, usando-se um “scanner HP ScanJet II v.2.5.”, sendo o “software” utilizado para o tratamento das imagens, o “Paint Shop Pro v.5.0”. A imagem foi digitalizada, brilho (variável entre 125 e 145), contraste 185 e escala de 800%. As imagens foram gravadas com extensão \*.jpg e levadas ao analisador de imagens. Para a leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 4.1, da Mídia Cibertecnicos. Para a análise das lâminas da cartilagem epifisária, foram consideradas três regiões distintas, caracterizadas pela aparência morfológica: 1. área da cartilagem de crescimento (zona

de repouso e de cartilagem em maturação), 2. área de cartilagem hipertrófica e 3. área total da epífise, segundo Thorp *et al.* (1993). A zona de cartilagem calcificada foi considerada como o limite inferior para a determinação do espessamento da zona hipertrófica, no diagnóstico da discondroplasia tibial. As medidas relativas da zona de crescimento e zona de cartilagem hipertrófica foram obtidas pela fórmula:

$$\text{Medida relativa} = (\text{medida de cada zona/área total da cartilagem epifisária}) \times 100$$

Os dados foram analisados, segundo o modelo de superfície de resposta, utilizando o Software SAEG(Universidade Federal de Viçosa, 1997).

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ijk} = b_0 + b_1L_i + b_2A_j + b_3L_i^2 + b_4A_j^2 + b_5L_iA_j + e_{ijk}$$

em que:

$Y_{ijk}$ : observação da variável dependente na unidade experimental k submetida ao nível i de Lys,  $i = 1,2,3,4$  ( $1 = 1,189\%$ ;  $2 = 1,427\%$ ;  $3 = 1,665\%$ ;  $4 = 1,902\%$ ) e ao nível j de Arg,  $j = 1,2,3,4$  ( $1 = 1,217\%$ ;  $2 = 1,416\%$ ;  $3 = 1,615\%$ ;  $4 = 1,814\%$ );

$b_0$ : constante;

$b_1$  e  $b_2$ : coeficientes lineares de regressão da variável dependente em função dos níveis de Lys e Arg, respectivamente;

$b_3$  e  $b_4$ : coeficientes quadráticos de regressão da variável dependente em função dos níveis de Lys e Arg, respectivamente;

$b_5$ : é o coeficiente de regressão referente ao efeito de interação linear entre os níveis de Lys e Arg;

$e_{ijk}$ : é o erro aleatório associado a cada observação  $y_{ilk}$

Os coeficientes de determinação foram calculados como percentagem da soma de quadrados do modelo em relação à soma de quadrados total.

## Resultados e Discussão

Os resultados referentes ao diâmetro do fêmur e da tíbia dos frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com Lys e Arg são representados na Tabela 2.

Não houve efeito dos níveis de Lys e Arg ( $p > 0,05$ ) no diâmetro do fêmur aos 7 e 42 dias. Entretanto, aos 21 dias o diâmetro do fêmur foi afetado ( $p < 0,05$ ) de forma linear negativa pela Lys e linear positiva pela Arg (Figura 1).

Para o diâmetro da tíbia, foi observado efeito dos tratamentos ( $p < 0,05$ ) em todas idades estudadas. Aos 21 dias, o comportamento foi semelhante ao descrito para o

fêmur (Figura 2). Entretanto, aos 7 e 42 dias, houve interação ( $p < 0,05$ ) entre os aminoácidos, modificando as respostas individuais. Aos 7 dias, ambos os aminoácidos afetaram negativamente o diâmetro, mas a partir do incremento de 1,664% de Lys, a suplementação com Arg passa a melhorar de forma crescente o diâmetro dos ossos (Figura 2). Aos 42 dias, o mesmo comportamento foi observado, mas o efeito negativo da Lys foi amenizado com a adição de Arg, a partir do nível de 1,272% de Lys (Figura 2).

Tabela 2. Análise de regressão dos parâmetros morfológicos do fêmur e da tíbia de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Efeito dos níveis*	Parâmetros ósseos			
	Fêmur		Tíbia	
	Diâmetro, mm	Índice de Seedor	Diâmetro, mm	Índice de Seedor
	7 dias			
Lys	NS	linear	NS	linear
Arg	NS	NS	quadrático	linear
Interação	NS	NS	NS	**
CV (%)	5,31	6,24	6,34	4,77
	21 dias			
Lys	linear	quadrático	linear	linear
Arg	linear	linear	linear	linear
Interação	NS	NS	NS	NS
CV (%)	3,90	4,32	4,66	3,26
	42 dias			
Lys	NS	NS	linear	NS
Arg	NS	NS	linear	linear
Interação	NS	NS	**	NS
CV (%)	4,20	5,70	4,98	3,59

\* Correspondem a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível.

\*\* significativa ( $p < 0,05$ ).

CV: coeficiente de variação; NS= não significativo ( $p > 0,05$ )

Este efeito negativo da Lys sobre o crescimento ósseo pode estar relacionado ao melhor desempenho produtivo (Capítulo III) alcançado pelas aves que receberam dietas suplementadas com Lys, uma vez que o excesso de sobrecarga muscular pode ser deletério à integridade do esqueleto em formação. Por outro lado, a suplementação de Arg, em níveis elevados, ‘upregulate’ à atividade da arginase renal, elevando os níveis de ornitina que participa da biossíntese das poliaminas envolvidas no processo de multiplicação celular (Meijer, *et al.*, 1990; Wu & Morris, 1998) melhorando, desta forma, o suporte ósseo.

Tatara *et al.* (2005a) obtiveram aumento significativo da densidade mineral óssea da tíbia de perus que receberam dietas suplementadas com ornitina alfa-cetoglutarato, um sal formado por uma molécula de alfa-cetoglutarato e duas moléculas de ornitina.

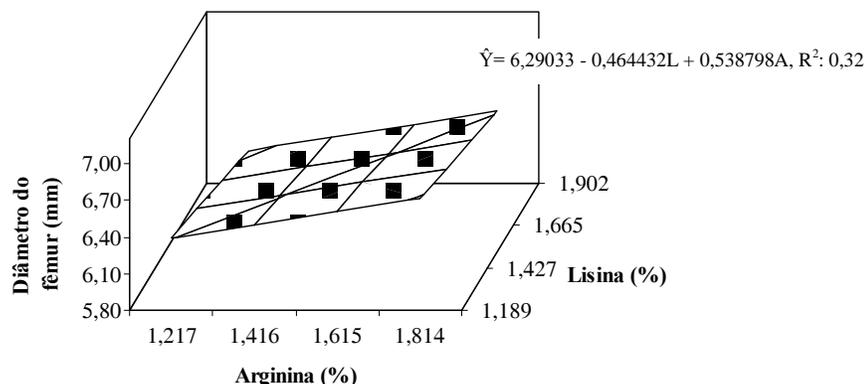


Figura 1. Diâmetro do fêmur dos frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Os resultados referentes ao índice de Seedor do fêmur e da tíbia dos frangos de corte, apresentados na Tabela 2, confirmam estes resultados.

O índice de Seedor, que é uma medida indireta da densidade óssea, do fêmur e da tíbia foi influenciado de maneira distinta. Aos 7 dias de idade, o índice de Seedor do fêmur foi afetado negativamente ( $p < 0,05$ ) pela adição de Lys, da mesma forma do observado para o diâmetro (Figura 3). Aos 21 dias, observou-se comportamento quadrático ( $p < 0,05$ ) do índice com o maior valor no nível de 1,437% de Lys e linear positivo ( $p < 0,05$ ) da Arg. Aos 42 dias não foi observado diferença ( $p > 0,05$ ) no comportamento deste parâmetro.

Na tíbia, em todas as idades avaliadas houve influência ( $p < 0,05$ ) dos tratamentos sobre o índice de Seedor. Aos 7 dias, houve efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) com o menor valor no nível de 1,577% de Arg e aos 21 dias, o índice de Seedor aumentou linearmente ( $p < 0,05$ ) pela adição de Arg e diminuiu linearmente ( $p < 0,05$ ) pela inclusão de Lys, enquanto que aos 42 dias, a adição de Arg, na fase inicial, resultou em efeito linear positivo deste índice (Figura 4).

O comportamento positivo da suplementação de Arg sobre a morfologia do fêmur e da tíbia pressupõe melhor densidade desses ossos.

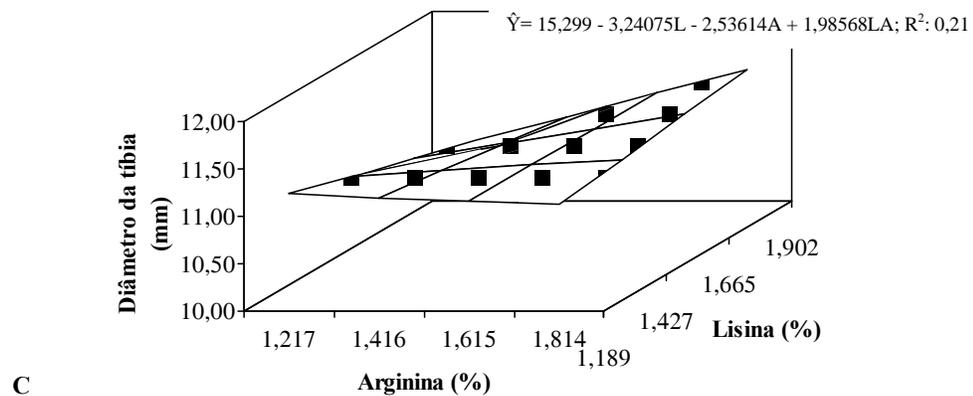
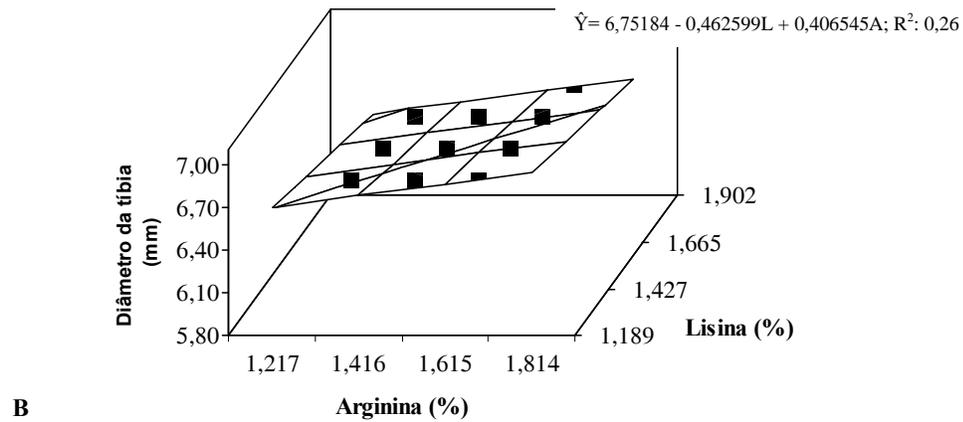
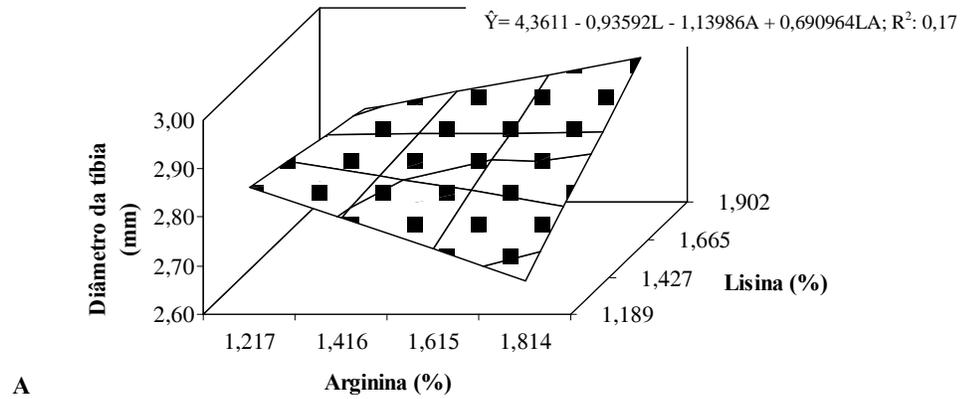


Figura 2. Diâmetro da tíbia dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

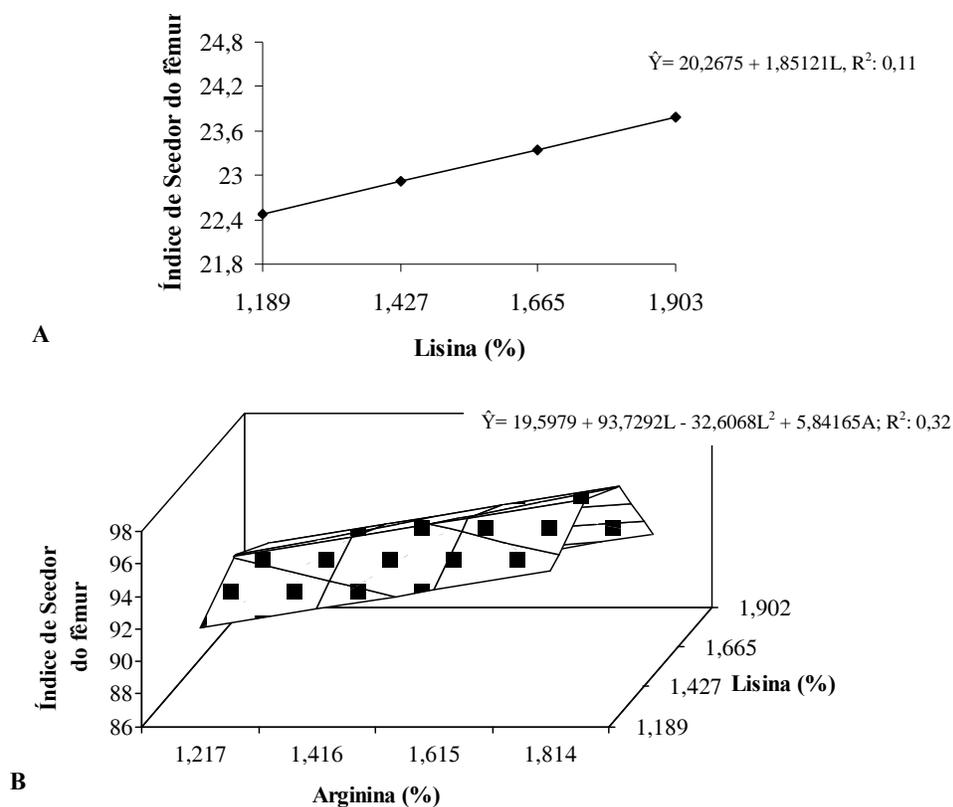


Figura 3. Índice de Seedor do fêmur dos frangos de corte aos 7 (A) e 21 (B) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Os resultados referentes à resistência óssea à quebra, à espessura do osso cortical e ao percentual de cinzas ósseas da tíbia dos frangos de corte alimentados, com dietas suplementadas com Lys e Arg, são representados na Tabela 3.

Houve efeito ( $p < 0,05$ ) dos níveis de Lys e Arg, na espessura do osso cortical somente aos 21 dias. Nesta idade, foi observado efeito quadrático com menor valor pela adição de 1,504% de Lys e linear crescente pela Arg (Figura 5).

A espessura do osso cortical aumenta progressivamente até os 21 dias de idade, período de intensa formação óssea para o fornecimento de adequado suporte esquelético para suportar as altas taxas de crescimento dos frangos de corte. A partir desta idade, a espessura do osso cortical se mantém constante, enquanto que o diâmetro dos ossos aumenta com a idade processo dinâmico de aposição e reabsorção óssea.

A suplementação de aminoácidos pode minimizar a quantidade de ossos quebrados durante o processamento, fator extremamente relevante para a indústria, visto que estes causam maior proporção de manchas de sangue nos cortes desossados. A

fragilidade e a porosidade do osso são correlacionadas também com incidência de fragmentos do osso em produtos desossados (Gregory & Wilkins, 1992).

Corzo *et al.* (2003) observaram que o aumento de Arg acima das necessidades para ganho de peso reduziu o percentual de asas quebradas no processamento de carcaça.

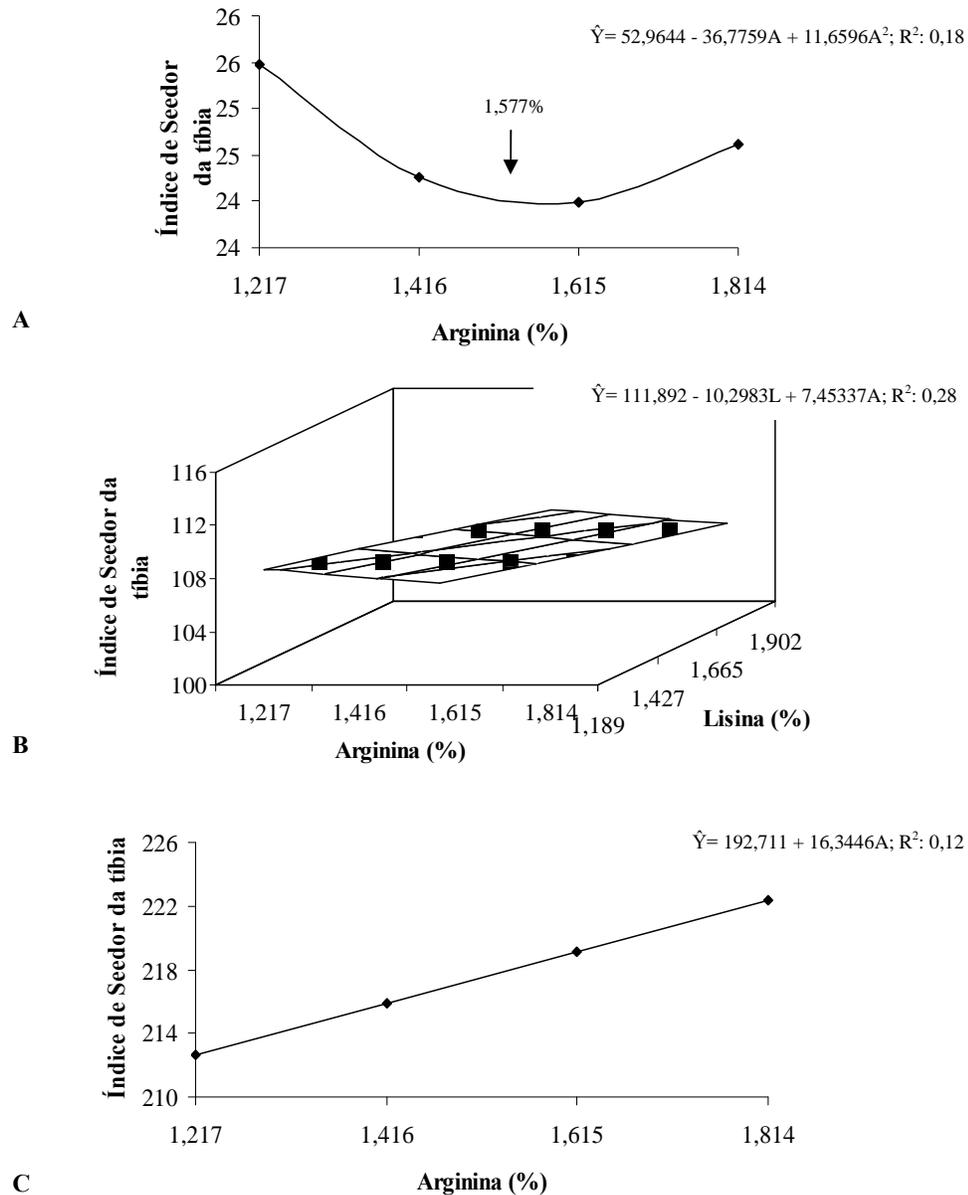


Figura 4. Índice de Seedor da tíbia dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Tabela 3. Análise de regressão dos parâmetros ósseos da tíbia de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Efeito dos níveis*	Parâmetros ósseos da tíbia		
	Espessura do osso cortical, mm	Resistência óssea à quebra, N	Cinzas ósseas %
		7 dias	
Lys	NS	NS	NS
Arg	NS	quadrático	NS
Interação	NS	NS	NS
CV (%)	6,88	22,80	3,39
		21 dias	
Lys	Quadrático	quadrático	NS
Arg	Linear	quadrático	NS
Interação	**	NS	NS
CV (%)	8,48	23,48	2,95
		42 dias	
Lys	NS	quadrático	NS
Arg	NS	linear	NS
Interação	NS	**	NS
CV (%)	9,04	23,95	2,81

\* Correspondem a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível.

\*\* significativa (p<0,05).

CV: coeficiente de variação; NS= não significativo (p>0,05)

Houve influência (p<0,05) da suplementação de Arg e Lys sobre os valores de resistência óssea à quebra em todas as idades estudadas. Aos 7 dias, houve efeito quadrático com a menor resposta no nível de 1,568% de Arg. Já, aos 21 dias, o comportamento quadrático da variável foi observado pela suplementação de ambos os aminoácidos. A adição de 1,529% de Lys melhorou a resistência, enquanto que a suplementação de 1,460% de Arg foi associada aos menores valores de resistência óssea (Figura 6).

O comportamento da resistência óssea em resposta aos níveis de Lys, foi oposto ao observado para a espessura do osso cortical.

Todavia, aos 42 dias houve interação (p<0,05) entre os aminoácidos mediante à suplementação na fase inicial (Figura 6). A suplementação de Arg só aumentou a resistência da tíbia quando a Lys foi mantida no nível mais baixo de suplementação. Conforme a Lys foi adicionada às dietas, houve aumento na resistência óssea, por outro lado, a suplementação de Arg resultou em efeito linear negativo sobre este parâmetro.

Os valores de resistência óssea à quebra, obtidos no presente trabalho, aos 21 e 42 dias, foram menores ( 107 e 122 N), respectivamente, que aqueles citados na revisão de Torres *et al.* (2005), que apontam valores de 171 e 236 N, respectivamente,

entretanto utilizando ossos frescos. De acordo com Kim *et al.* (2004), essa diferença pode ser atribuída ao preparo dos ossos. Estes autores citam que os ossos frescos descrevem melhor a resistência à quebra do que secos ou secos e desengordurados por apresentarem melhor correlação com os demais parâmetros preditores da qualidade óssea.

Rath *et al.* (1999) observaram que apesar de existir uma correlação positiva entre a resistência óssea e cinzas, a correlação com as ligações cruzadas das fibrilas do colágeno e a fluorescência da matriz orgânica é ainda mais significativa. Estes resultados sugerem que a resistência óssea é influenciada pelo conteúdo de *cross-linking* das fibrilas do colágeno. Diversos outros pesquisadores concordam que a mineralização do osso não é a única propriedade mecânica relacionada à força de quebra (Massé et al., 1996; Rath *et al.*, 2000). Tatara *et al.* (2005b) citam que alterações no *cross-linkage* do colágeno podem estar envolvidas na melhora da qualidade óssea.

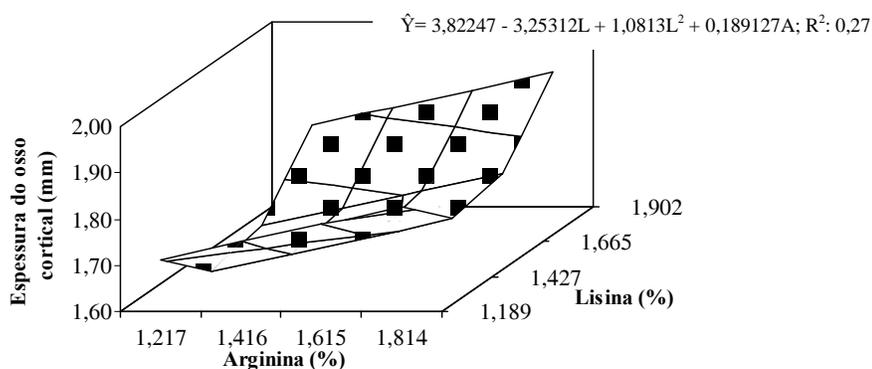


Figura 5. Espessura do osso cortical da tíbia dos frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Lys e prolina são os principais aminoácidos que compõem a molécula de colágeno. A lisil e a prolil hidroxilases catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos colágenos, e essas modificações pós-translacionais permitem a formação e estabilização do colágeno de tripla hélice, e sua subsequente secreção no espaço extracelular e formação das fibrilas de colágeno.

Segundo Sekine *et al.* (1994), os aminoácidos agem sobre o crescimento transversal do osso e que essa ação facilita a formação da matriz e a calcificação óssea.

Neste sentido, é possível que a resposta positiva da resistência óssea frente à suplementação de Lys possa ser decorrente do seu envolvimento na formação do colágeno que compõe a matriz orgânica do osso.

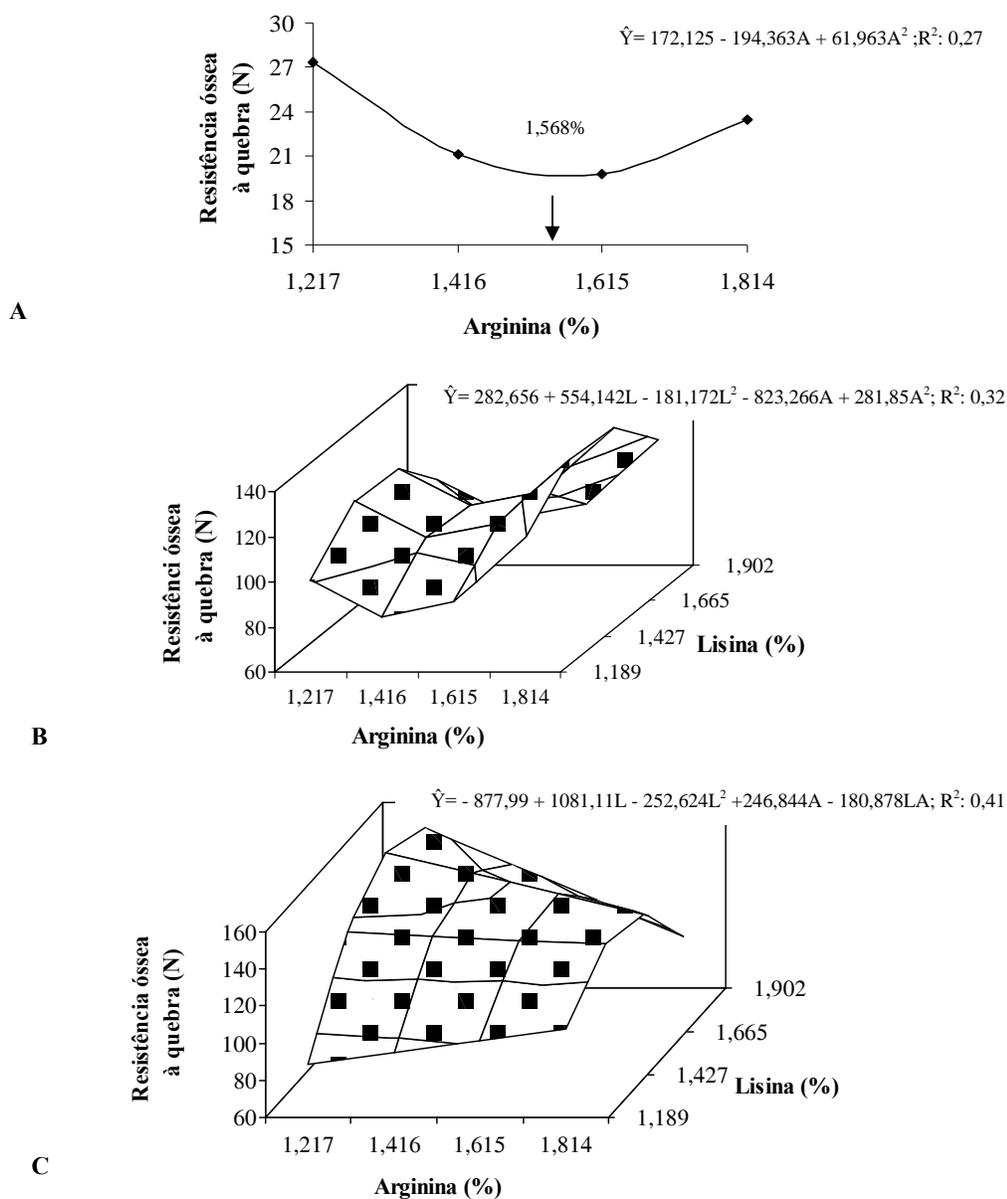


Figura 6. Resistência óssea à quebra da tíbia dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Os resultados obtidos para cinzas ósseas não diferiram ( $p > 0,05$ ) em nenhuma idade estudada (Tabela 3), o que já era esperado, uma vez que os aminoácidos estão associados à matriz orgânica do osso. Confirmam, também, que a resistência óssea é uma função do volume ósseo e, por isso, também, é afetada pela porção orgânica do osso e não apenas pela mineralização da matriz.

Os resultados referentes à atividade da fosfatase alcalina sérica e IGF-I plasmático estão representados na Tabela 4. Os valores de fosfatase alcalina sérica

foram afetados ( $p < 0,05$ ) aos 7 e 42 dias. Aos 7 dias, a adição de Lys resultou numa resposta cúbica, sendo que a maior elevação da atividade da enzima foi obtida com incrementos de 46% (1,736%) acima do valor recomendado. Aos 42 dias, os níveis Arg influenciaram de forma quadrática o comportamento da fosfatase alcalina, sendo que o nível de 1,432% de Arg foi associado com a menor elevação plasmática desta enzima (Figura 7).

Tabela 4. Análise de regressão dos parâmetros sanguíneos (IGF-I e fosfatase alcalina) de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Efeito dos níveis*	Parâmetros sanguíneos	
	Fosfatase alcalina sérica, u/l	IGF-I plasmático, ng/ml
	7 dias	
Lys	cúbico	quadrático
Arg	NS	NS
Interação	NS	NS
CV (%)	20,07	40,22
	21 dias	
Lys	NS	quadrático
Arg	NS	NS
Interação	NS	NS
CV (%)	33,17	42,03
	42 dias	
Lys	NS	quadrático
Arg	quadrático	quadrático
Interação	NS	NS
CV (%)	38,96	29,36

\* Correspondem a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível.

\*\* significativa ( $p < 0,05$ ).

CV: coeficiente de variação; NS= ( $p > 0,05$ )

A fosfatase alcalina é um marcador do metabolismo ósseo. A sua atividade é associada com o aumento da atividade osteoblástica no osso (Moss, 1982) e é decrescente à medida que ocorre a maturação óssea.

Esta enzima tem origem, principalmente, nos ossos e fígado. Aumentos fisiológicos são encontrados durante o crescimento ósseo, enquanto que aumentos patológicos são largamente associados com distúrbios hepatobiliares e doenças ósseas. Neste sentido, foi dosada, também, a gama-GT (gama glutamil transpeptidase) que, por se tratar do indicador mais sensível de doenças hepatobiliares, foi utilizada na diferenciação entre os valores fisiológicos e patológicos da fosfatase alcalina. Após a análise dos valores obtidos, pode-se constatar que, para nenhuma amostra, foram

encontrados valores aumentados de gama-GT. Assim, os valores de fosfatase alcalina foram relacionados apenas ao metabolismo ósseo.

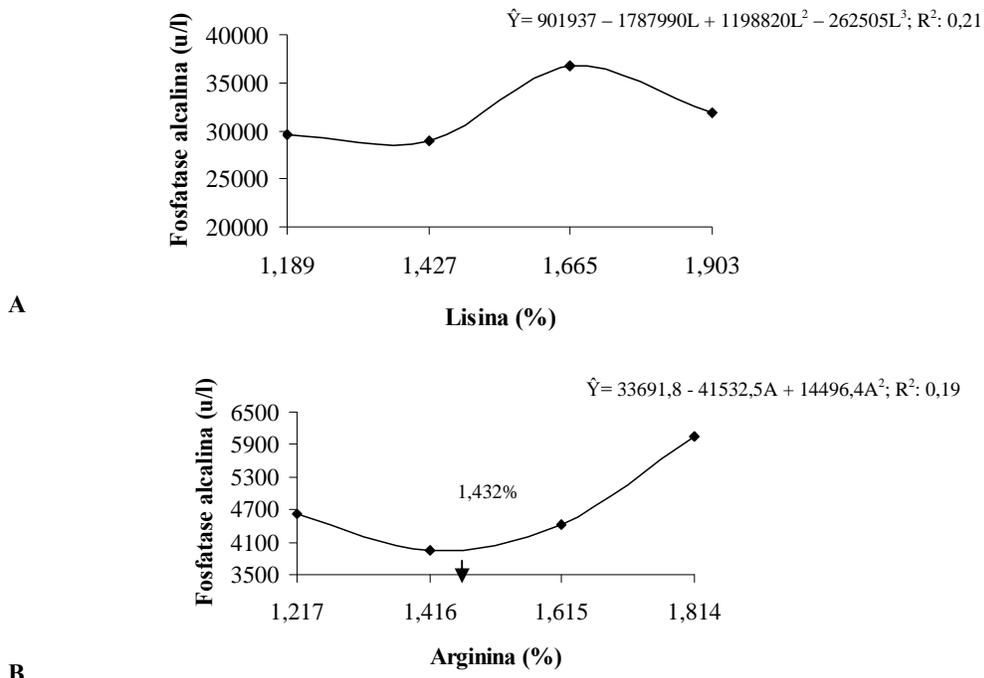


Figura 7. Atividade da fosfatase alcalina sérica dos frangos de corte aos 7 (A) e 42 (B) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Com base nos resultados observados, a adição de Lys pode elevar a atividade desta enzima na fase coincidente com as maiores taxas de mineralização óssea, que ocorrem dos 4 aos 11 dias de idade (Williams *et al.*, 2000). Como esta enzima ativa as fibras de colágeno para a deposição de sais de cálcio e é conhecido que a Lys está envolvida na formação do colágeno (Oxlund *et al.*, 1995), pode ser sugerida associação de maior requerimento de Lys, nesta fase, para a síntese de colágeno e, por isso, a atividade da enzima foi elevada concomitantemente.

Este fator pode ter contribuído na reposta positiva da resistência à quebra dos ossos à suplementação de Lys aos 21 e 42 dias, o que pode estar associado à síntese de colágeno na fase inicial.

Resultados que corroboram com o estudo ‘in vitro’ de Conconi *et al.* (2001) com cultura de osteoblastos enriquecida com solução de aminoácidos essenciais (Arg, Lys, Met, Thr e Trp). Estes autores encontraram níveis significativamente aumentados de

fosfatase alcalina e síntese de colágeno, mostrando que a suplementação de aminoácidos afeta a atividade osteoblástica.

Já, aos 42 dias, houve efeito quadrático descendente em resposta à suplementação de 1,432% de Arg na fase inicial. Nesta idade, a mineralização óssea está basicamente completa. Assim, a elevação da atividade da enzima pode estar associada com desordens no crescimento ou remodelamento ósseo (Brenes *et al.*, 2003).

Os efeitos dos aminoácidos essenciais no tecido ósseo em crescimento, de acordo com Baylink *et al.* (1993), podem ser mediados pelo IGF-I.

Os resultados obtidos do IGF-I plasmático, no presente trabalho, confirmam a participação da Lys e Arg na elevação deste fator no plasma das aves (Tabela 4).

Os valores de IGF-I encontrados são semelhantes aos descritos na literatura (Kikuchi, et al, 1991; Giachetto *et al.*, 2004). Há uma elevação crescente dos níveis de IGF-I até a terceira semana permanecendo relativamente constante até a sexta semana.

Aos 7 e 21 dias, apenas a Lys influenciou os níveis plasmáticos de IGF-I (Figura 8). Houve comportamento quadrático ( $p < 0,05$ ) dos níveis de IGF-I com valores máximos nos níveis de 1,564 e 1,543%, respectivamente. Porém, aos 42 dias ambos os aminoácidos estimularam a secreção de IGF-I, resultando num efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) pelo nível de 1,534% de Lys e 1,487% de Arg. (Figura 08).

O fato da Arg não ter afetado os níveis plasmáticos de IGF-I, aos 21 dias de idade, pode ser pela relação antagônica com a Lys. Nesta mesma idade, foi observada interação significativa entre Lys e Arg sobre o desempenho das aves (Capítulo III). O requerimento de Lys diminuiu em relação às primeiras semanas, desta forma o excesso de Lys plasmática atuaria de forma mais expressiva sobre a atividade da arginase renal, degradando a Arg em ornitina e uréia

Em aves, particularmente, a atividade da arginase renal é, marcadamente, aumentada pelo excesso de Lys na dieta (Jones et al, 1967), o que eleva o catabolismo da Arg e desta forma não há nível plasmático adequado de Arg para agir como estimuladora da secreção de GH/IGF; o que também explica o resultado obtido aos 42 dias de idade. A elevação plasmática de IGF-I observada aos 42 dias pela Arg, provavelmente, esteja relacionada com a retirada de Lys e Arg em doses já consideradas excessivas para o final da fase inicial.

Também, pode ser inferido que o baixo consumo de ração frente à suplementação de Arg, observada na primeira semana (Capítulo III), interferiu na concentração plasmática do IGF-I. A privação de nutrientes, em virtude da restrição ou jejum, causa redução na

concentração sérica do IGF-I (Thiessen *et al.*, 1994; Kita *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2006). Este fator do crescimento, causado pelo seu mecanismo de regulação, seu efeito promotor de crescimento e estreita ligação com o balanço de nitrogênio, representa o mais significativo indicador sérico da adequação dos nutrientes ingeridos (Sun *et al.*, 2006).

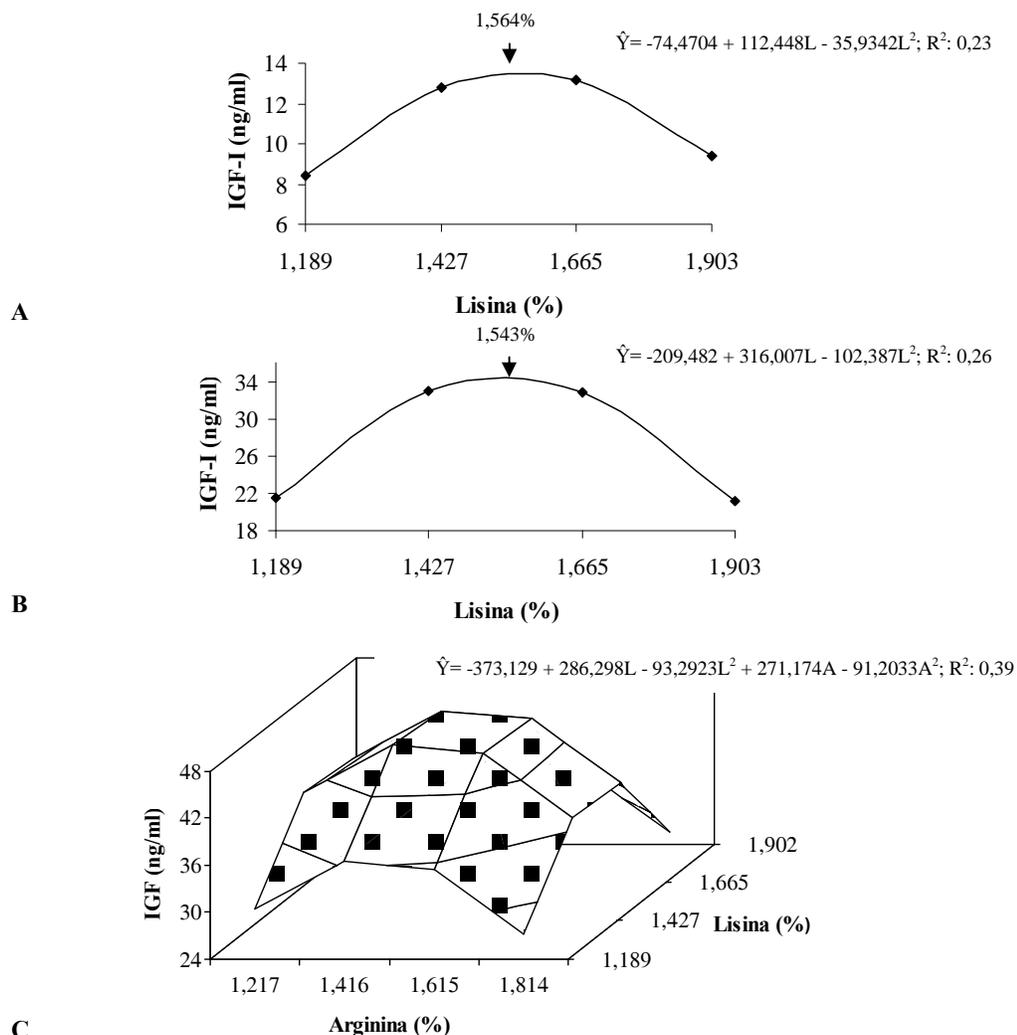


Figura 8. Níveis plasmáticos do IGF-I dos frangos de corte aos 7 (A), 21 (B) e 42 (C) dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

A Arg e Lys são consideradas potentes secretagogos, aumentando a liberação na corrente sanguínea da insulina, do GH e IGF-I (Newsholme *et al.*, 2005), devido à rápida despolarização da membrana plasmática ligada ao transporte de aminoácidos com a cadeia lateral positiva.

Mas, quase não existem resultados de pesquisa com aves demonstrando o efeito estimulatório de Lys e Arg sobre a secreção de GH ou IGF-I. Por outro lado, em mamíferos, essa ação dos aminoácidos é bem retratada desde a década de 60 por Merimee *et al.* (1969),

por Chevalley *et al.* (1998) demonstrando que Arg e Lys aumentaram a produção ‘in vitro’ de IGF-I por osteoblastos de ratos mantidos em cultura, e em humanos, por Albaroth *et al.* (1988) e Gianotti *et al.* (2000) que comprovam a participação da Arg na secreção do GH pela inibição da secreção de somatostatina. Também, por Kim *et al.* (2004), que observaram elevação na concentração plasmática de GH mediante à suplementação de Arg na dieta de leitões.

Pode ser questionável o envolvimento da Arg na secreção destes hormônios anabólicos em espécies uricotélicas, devido ao fato do ciclo bioquímico da uréia não ser funcional em aves, a Arg não é sintetizada ‘de novo’ e com isso o requerimento de Arg depende da disponibilidade de Arg dietética, da regulação da síntese de proteínas e principalmente do nível de Lys da dieta.

Por outro lado, o efeito positivo da Lys sobre o tecido ósseo pode estar relacionado à produção de colágeno que, segundo Hock *et al.* (1988), é estimulada pela ação do IGF-I.

Os resultados referentes a morfometria da placa de crescimento dos ossos dos frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com Lys e Arg são representados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise de regressão das medidas da área total da cartilagem epifisária tibial e das medidas relativas (% em relação à cartilagem epifisária tibial) da zona de crescimento (zona de repouso e maturação) e da zona de cartilagem hipertrófica) de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Efeito dos níveis*	Cartilagem epifisária tibial		
	Área total da cartilagem epifisária tibial, mm <sup>2</sup>	Zona de cartilagem de crescimento, %	Zona de cartilagem hipertrófica, %
		7 dias	
Lys	quadrático	NS	linear
Arg	linear	NS	NS
Interação	NS	NS	NS
CV (%)	11,68	11,53	8,83
		21 dias	
Lys	NS	NS	NS
Arg	NS	NS	NS
Interação	NS	NS	NS
CV (%)	11,72	15,52	15,29
		42 dias	
Lys	linear	linear	Linear
Arg	linear	NS	quadrático
Interação	NS	NS	**
CV (%)	22,98	16,72	14,50

\* Correspondem a 1,189%; 1,427%; 1,665% e 1,902% de Lys digestível e a 1,217%; 1,416%; 1,615% e 1,814% de Arg digestível.

\*\* significativa (p<0,05).

CV: coeficiente de variação; NS= (p>0,05)

Aos 7 dias, a área total da cartilagem epifisária tibial apresentou efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) com melhor resposta ao nível de 1,568% de Lys e linear negativo em relação à Arg (Figura 9). Esse efeito da Lys pode ser associado ao percentual de área de cartilagem hipertrófica que respondeu de forma linear positiva ( $p < 0,05$ ) apenas frente aos níveis de Lys. O aumento da área de cartilagem hipertrófica é associado com a ocorrência de discondroplasia tibial (DT). De acordo com os resultados relatados, níveis de Lys, acima do recomendado podem contribuir negativamente com a incidência da doença. No entanto, este resultado pode ser decorrente da elevada taxa de crescimento, observado nas aves suplementadas com níveis de Lys acima do recomendado (Capítulo III), uma vez que a DT é associada com essa condição.

Porém, aos 21 dias, não houve efeito da suplementação de ambos os aminoácidos, provavelmente, em decorrência da interação observada entre Lys e Arg, cujo efeito depressivo de altos níveis de Lys sobre o peso das aves foi amenizado quando associado níveis mais elevados de Arg (Capítulo III).

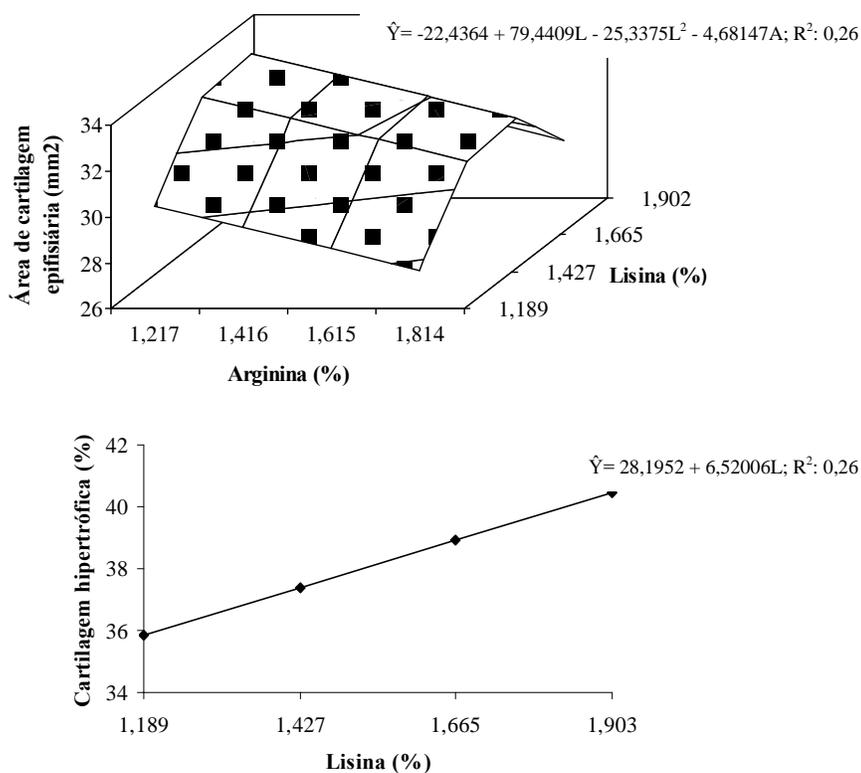


Figura 9. Área total da cartilagem epifisária e medida relativa da zona de cartilagem hipertrófica da tibia de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

O efeito da suplementação de Lys e Arg foi observado, ainda, aos 42 dias, apesar da dieta basal que as aves passaram a receber a partir dos 22 dias de idade. Ambos os aminoácidos afetaram ( $p < 0,050$ ) a área total da cartilagem epifisária tibial, de forma linear e positiva, enquanto que o percentual da zona de crescimento foi afetado ( $p < 0,05$ ) de forma linear negativa apenas pela Lys (Figura 10).

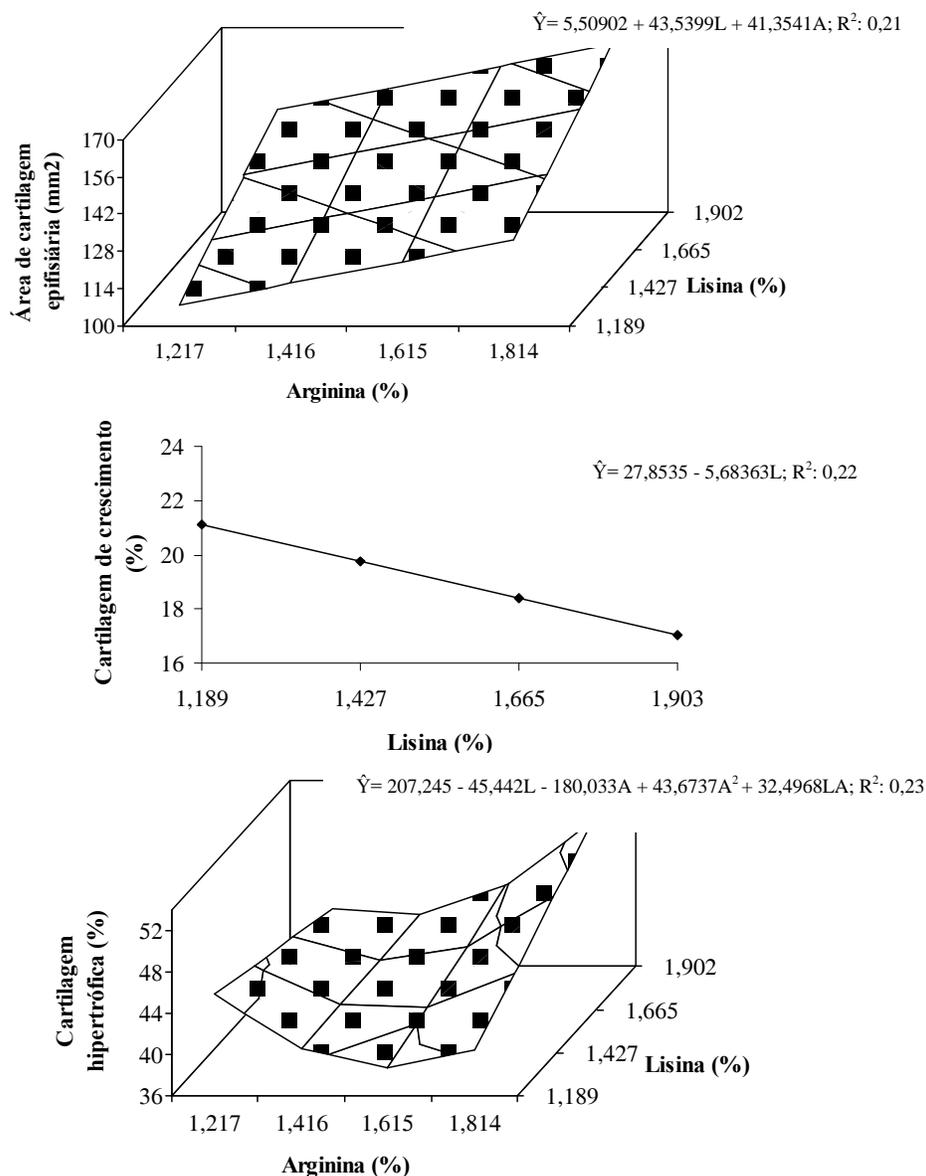


Figura 10. Área total da cartilagem epifisária e medidas relativas da zona de crescimento (zona de repouso e maturação) e da zona de cartilagem hipertrófica da tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Lys e Arg na dieta inicial

Houve interação ( $p < 0,05$ ) entre Lys e Arg no percentual de área de cartilagem hipertrófica. O efeito da Arg foi quadrático, com o ponto de mínima no nível de

1,398%, conforme foi adicionada Lys houve aumento no percentual da cartilagem hipertrófica (Figura 10).

Gadelha (2004) descreveu aumento na incidência de problemas de pernas nos frangos de corte, à medida que aumentou o nível de Lys na ração.

Pode ser sugerida uma analogia entre estes resultados e os obtidos para a atividade da fosfatase alcalina em relação ao efeito da Arg. Nesta mesma idade, foi observado o mesmo comportamento, mostrando haver correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre estas duas variáveis ( $r = 0,37$ ), o que confirma também que o aumento tanto do percentual de zona hipertrófica como da atividade da fosfatase podem estar associadas aos problemas locomotores como a DT.

A DT predispõe às infecções, às deformações ósseas e à diminuição da resistência óssea por uma porosidade excessiva do osso (Thorp, 1994; Oviedo & Ferket, 2005). Tais distúrbios podem estar acompanhados pela elevação da enzima, como consequência da intensa atividade osteoclástica observada nestas condições.

Os problemas de pernas em frangos de corte associado com dietas deficientes em Arg ou com altos níveis de Lys foram observados por vários autores desde a década de 40 (Hegsted *et al.*, 1941; Snyder, 1956; Jones, 1961; Sekine *et al.*, 1996; Gadelha, 2004).

Sekine *et al.* (1994) trabalhando com dietas com perfis diferentes de aminoácidos, adicionaram 80, 100 e 120% do nível recomendado e observaram que a resistência a fraturas da tíbia foi crescente em relação à suplementação.

Em um trabalho posterior, Sekine *et al.* (1996) observaram redução do ganho de peso e problemas de pernas em frangos de corte, quando a dieta continha 1,6% de Lys digestível, entretanto com a suplementação de 2,0% de Arg, os problemas de pernas foram amenizados ou desapareceram.

Elkin *et al.* (1978), Moraes *et al.* (1984) e Silva *et al.* (2001) sugerem que a incidência de anomalias ósseas pode estar mais relacionada com a matriz orgânica do tecido ósseo do que com a matriz mineral. Os aminoácidos podem atuar diretamente na formação da matriz óssea e podem também modular o crescimento e a diferenciação de osteoblastos (Conconi *et al.*, 2001).

### **Conclusão**

A suplementação de Lys e Arg em níveis acima das exigências influenciou o crescimento do tecido ósseo como resultado do antagonismo ou por mecanismos

específicos à estrutura e função de cada aminoácido. A adição de Arg contribuiu com o aumento do diâmetro, da densidade, da espessura óssea. No entanto, níveis excessivos de Arg na fase inicial levaram ao aumento da área hipertrófica da placa de crescimento e da atividade da fosfatase alcalina na idade de abate.

Por outro lado, a Lys afetou positivamente a resistência óssea à quebra, mas também pode contribuir negativamente com a ocorrência da DT.

A suplementação de Lys elevou os níveis plasmáticos de IGF-I, contudo é questionável o envolvimento da Arg na secreção do IGF-I como descrito em mamíferos.

O conjunto dos resultados apresentados quanto à participação da Arg na secreção do IGF-I e os efeitos dos aminoácidos, no metabolismo ósseo, demonstram o quão controverso ainda é esse assunto, e que mais estudos devem ser conduzidos para maior esclarecimento destes mecanismos.

### Referências

Alba-Roth J, Müller OA, Schopohl J, Werder K. Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1988; 67:1186-89.

Almeida-Paz ICL, Bruno LDG. Bone mineral density: review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2006; 8(2):69-73.

Association of Analytical Chemists. 13th ed. Washington , D.C.; 1980. p.21-47.

Austic RE, Scott RL. Involvement of food intake in the lysine-arginine antagonism in chicks. *Journal of Nutrition* 1975; 105(9):1122-31.

Ball RO., Urschel, KL, Pencharz, PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *Journal of Nutrition* 2007; 137(6):1626–1641.

Baylink, DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *Journal Bone Mineral Research* 1993; 8:565-72.

Beçak WPJ. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos S.A., 1976.

Brenes A, Viveros A, Arijia I, Centeno C, Pizarro M, Carmen B. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology* 2003; 110:210-19.

Chevalley T, Rizzoli R, Manen D, Caverzasio J, Bonjour JP. Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. *Bone* 1998; 23:103-9.

Conconi MT, Tommasini M, Muratori E, Parnigotto PP. Essential amino acids increase the growth and alkaline phosphatase activity in osteoblasts cultured in vitro. *IL Fármaco* 2001; 56:755-61.

Corr SA, Gentle MJ, Mccorquodale CC, Bennett D. The effect of morphology on the musculoskeletal system of the modern broiler. *Animal Welfare* 2003; 12(1):142-57.

Corzo A, Moran Jr ET, Hoehler D. Arginine Need of Heavy Broiler Males: Applying the Ideal Protein Concept. *Poultry Science* 2003; 82(3):402-7.

Edwards Jr HM. Nutrition and skeletal problems in poultry. *Poultry Science* 2000; 79(7):1018-23.

Elkin RG, Featherston WR, Rogler JC. Investigations of leg abnormalities in chicks consuming high tannin sorghum grain diets. *Poultry Science* 1978; 57(4):757-62.

Gadelha, AC. Resposta produtiva, imune e desenvolvimento ósseo de frangos de corte alimentados com diferentes relações de arginina e lisina digestíveis. [Tese]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004.

Giachetto PF. Ganho compensatório em frangos de corte: desempenho, características de carcaça, níveis plasmáticos de hormônios e expressão gênica do GH, IGF-I e seus receptores. [Tese]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2002.

Gregory NG, Wilkins LJ. Skeletal damage and bone defects during catching and processing. In: Whitehead CC, editor. *Bone biology and skeletal disorders in poultry*. Abingdon: Carfax Publishing Company; 1992. p.313-28.

Hegsted DM, Briggs GM, Elvehjen CA, Hart EB. The role of arginine and glycine in chick nutrition. *Journal Biology Chemistry* 1941;140:1919.

Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988; 122:254-60.

Huybrechts LM, King DB, Lauterio TJ, Marsh J, Scanes CG. Plasma concentrations of somatomedinC in hypophysectomized, dwarf and intact growing domestic fowl as determined by heterologous radioimmunoassay. *Journal of Endocrinology* 1985; 104:233-9.

Isaksson OG, Lindahl A, Nilson A, Isagaard J. Mechanism of stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone. *Endocrinology Review* 1987; 8:426-38.

Jones JD, Petersburg SJ, Burnett PC. The mechanism of the lysine-arginine antagonism in the chick: effect of lysine on digestion, kidney arginase, and liver transaminase. *Journal of Nutrition* 1967; 93(1):103-16.

- Jones JD. Lysine toxicity in the chick. *Journal of Nutrition* 1961; 73:107-12.
- Kestin SC, Gordon S, SU G, Sorensen, P. Relationship in broiler chickens between lameness, liveweight, growth rate and age. *Veterinary Record* 2001; 148:195-97.
- Kikuchi K, Buonomo FC, Kajimoto Y, Rotwein P. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development. *Endocrinology* 1991; 128(3):1323-28.
- Kim SW, Mcpherson RL, Wu G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young piglets. *Journal of Nutrition* 2004; 134:625-30.
- Kita K, Tomas FM, Owens PC, Knowles SE, Forbes BE, Upton Z, Hughes R, Ballard FJ. Influence of nutrition on hepatic IGF-I mRNA levels and plasma concentrations of IGF-I and IGF-II in meat-type chickens. *Journal of Endocrinology* 1996; 49:181-90.
- Lilburn MS. Skeletal growth of commercial poultry species. *Poultry Science* 1994; 73(5):897-903.
- Massé PG, Rinnac CM, Yamauchi M, Coburn SP, Rucker RB, Howell DS. Pyridoxine deficiency affects biomechanical properties of chick tibial bone. *Bone* 1996; 18:567–574.
- Meijer AJ, Lamers WH, and Chamuleau AFM. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews* 1990; 70(3):701–748.
- Mendonça Jr CX. Enfermidades do sistema locomotor. In: Berchieri Jr A, Macari M, editors. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA; 2000. p.449-64.
- Merimee JT, Rabinowitz D, Fineberg SE. Arginine-initiated release of human growth hormone. Factors modifying the response in normal man. *New England Journal of Medicine* 1969; 280:1434-438.
- Moraes GHK, Rogler JC, Featherston WR. Effects of nonspecific deficiency on growth rate and leg problems in chicks. *Poultry Science* 1984; 63(2):344-53.
- Moss FP. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. *American Journal of Anatomy* 1968; 122:555-63.
- Nelson TS, Kirby LK, Johnson ZB. Effect of calcium, phosphorus and energy on the incidence of weak legs in heavy male broiler. *Journal Applied Poultry Research* 1992; 1(1):11-18.
- Newsholme P, Brennnan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical Science* 2005; 108:185–194.
- NRC. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry*. 8<sup>th</sup> rev. ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Oviedo EO, Ferket PR. Nutritional factors that affect leg problems in meat poultry: A Review. In: Ferket PR, editor. Proceedings of the 32nd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference; 2005; North Carolina: Carolina Feed Industry Association in Cooperation with NC State University; 2005. p.58.

Oxlund H, Barkman M, Ortoft G, Andreassen TT. Reduced concentration of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone, *Bone* 1995; 17:365–71.

Praul CA, Ford BC, Gay CV, Pines M, Leach RM. Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 2000; 79(7):1009-1013.

Rath NC, Huff GR, Huff WE, Balog JM. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Science* 2000; 79(7):1024-32.

Rath NC, Huff WE, Bayari GR, Balog JM. Cell death in avian tibial dyschondroplasia. *Avian Diseases* 1998; 42:72-79.

Rath NC, Balog JM, Huff WE, Huff GR, Kulkarni GB, Tierce JF Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibia of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens. *Poultry Science* 1999; 78(7):1232-9.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2000. 141p.

Seedor JG. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 1993; 4:265-70.

Sekine T, Ueno K, Watanabe E, Kadowaki W, Ishibashi T. Effect of dietary and arginine levels on bone development in broiler chicks. *Animal Science and Technology* 1996; 67(1):7-13.

Sekine T, Watanabe E, Ishibashi T. Influence of dietary amino acids and calcium-available phosphorus on bone development of female broiler chicks. *Animal Science and Technology* 1994; 65(9):999-1007.

Silva FA, Moraes GHK, Rodrigues ACP, Oliveira MAO, 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. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001; 30(6):2067-77.

Snyder JW, Morrison WD, Scott HM. The arginine requirement of chicks fed purified and corn-soya diets. *Poultry Science* 1956; (32):852-5.

Sun JM, Richards MP, Rosebrough RW, Ashwell CM, Mcmurtry JP, Coon CN. The relationship of body composition, feed intake and metabolic hormones for broiler breeder females. *Poultry Science* 2006; 85(9):1173-84.

Tatara MR, Brodzki A, Krupski W, Sliwa E, Silmanowicz P, Majcher P, Pierzynowski SG, Studzin T. Effects of  $\alpha$ -Ketoglutarate on Bone Homeostasis and Plasma Amino Acids in Turkeys. *Poultry Science* 2005a; 84( ):1604–1609.

Tatara, MR, Krupski W, Majcher P, Studzin T. Long-term denervation of the humerus in turkeys as an experimental model for osteopenia. *Poultry Science* 2005b; 84:718–722.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 1994; 15(1):80-101.

Thorp BH. Skeletal disorders in the fowl: a review. *Avian Pathology* 1994; 23:203-36.

Torres DCR, Barbosa AA, Moraes GHK, Torres RA, Rodrigues CS, Lucia RMD. Physical, chemical, and mechanical aspects of male and female broiler tibiotarsus. In: *Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the Brazilian Animal Science Society*; 2005. p.25-28.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG; sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário. Versão 7.1. Viçosa, 1997. 150p.

Williams BS, Solomon D, Waddington B, Thorp M, Farquharson C. Skeletal development in the meat-type chicken. *British Poultry Science* 2000; 41:141-9.

Wu G and Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* 1998; 336:1–17.

## **V - Efeito da Suplementação de Arginina na Dieta Inicial sobre o Desempenho Produtivo, o Desenvolvimento dos Órgãos Linfóides e a Morfometria da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte**

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de arginina (Arg) na dieta inicial sobre o desempenho produtivo, o peso dos órgãos linfóides, a área de tecido linfóide da bolsa cloacal e a morfometria da mucosa intestinal do duodeno e jejuno dos frangos corte. Foram utilizados 990 pintos de corte, Cobb, machos, os quais foram alocados aleatoriamente de acordo com um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições de 33 aves cada. Os tratamentos consistiram de uma dieta basal com 1,390% de Arg digestível (sem suplementação) e quatro níveis dietéticos (1,490%; 1,590%; 1,690% e 1,790%), mantendo uma relação com a Lys de 1,103; 1,183; 1,262; 1,341 e 1,421%, respectivamente. A suplementação de Arg melhorou ( $p < 0,05$ ) o peso vivo e a conversão alimentar, sem alterar o consumo das aves na fase inicial. Porém, esse efeito não foi observado ( $p > 0,05$ ) ao final da fase de crescimento em que as aves não receberam suplementação dietética de Arg, indicando que a suplementação acima dos níveis recomendados pode ser necessária para que a ave expresse o seu máximo potencial de ganho de peso. O efeito positivo ( $p < 0,05$ ) da suplementação de Arg sobre o peso dos órgãos linfóides foi mais evidente na primeira semana para o baço e a bolsa cloacal, sendo que o timo ainda respondeu positivamente até o final da fase inicial. Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) da suplementação de Arg sobre o peso e comprimento do intestino delgado em nenhuma idade avaliada, mas houve aumento ( $p < 0,05$ ) da relação vilo:cripta do duodeno na primeira semana.

Palavras-chave: aminoácido, sistema imune, peso vivo, timo, relação vilo:cripta

**V – Effect of Dietary Arginine Supplementation in the Initial Phase on Performance, Lymphoid Organ Development and Small Intestine Morphometrics of Broiler Chickens**

ABSTRACT: Study determined the effects of graded dietary levels of arginine (Arg) during the initial diet on performance and lymphoid organ weight, lymphoid tissue area of Fabricius bursa and the intestine morphometrics of broiler chickens. Nine hundred and ninety male Cobb broilers were reared in a complete randomized design with five treatments and six replicates of 33 birds each. Dietary treatments consisted of one basal diet (not supplemented Arg) and four supplemented digestible Arg levels (1.390%; 1.490%; 1.590%; 1.690% and 1.790%), maintaining a relationship with Lys of 1.103; 1.183; 1.262; 1.341 and 1.421%, respectively. Addition of Arg levels improved ( $p < 0.05$ ) body weight and feed:gain ratio, without modifying fowl's consumption during the initial phase. However, this effect was not observed ( $p > 0.05$ ) to the end of the growth phase when the fowls did not receive Arg supplementation in the diet. This fact indicates that supplementation above recommended level may be necessary for broiler chickens' maximum performance. Positive effects ( $p < 0.05$ ) of the Arg supplementation on the lymphoid organ weights were more evident, in the first week, for spleen and Fabricius bursa, while the thymus still answered positively until the end of the initial phase. There was no effect ( $p > 0.05$ ) of Arg on the length and weight of the small intestine in any evaluated age, although an increase ( $p < 0.05$ ) in the relation vilo:cripta of the duodeno during the first week occurred.

Key words: amino acid, immune system, body weight, thymus, relation vilo:cripta

## Introdução

As pesquisas relativas à nutrição de frangos de corte durante o período inicial de vida têm sido intensificadas e difundidas devido à maior representatividade no crescimento das modernas linhagens de frangos de corte em relação ao período total de criação.

A seleção genética que é feita nos últimos anos enfatizando características de maior precocidade e produção em detrimento de atributos de resistência, rusticidade e, particularmente, de melhor desempenho do sistema imune, tornou ainda mais relevante a busca por soluções alternativas imunomoduladoras. O aminoácido Arg, além de constituir peptídeos e proteínas em todos os organismos vivos, é precursor de muitos compostos nitrogenados que possuem importantes funções fisiológicas.

Wu & Morris (1998) descrevem a arginina (Arg) como “um dos mais versáteis aminoácidos nas células animais”. De fato, a Arg é requerida para síntese de vários compostos tais como ornitina, poliaminas (espermidina, espermina e putrescina), prolina, creatina, síntese de proteínas, óxido nítrico (NO) e citrulina, além de glutamato e agmatina em mamíferos. A Arg é também considerada um potente secretagogo, que aumenta a liberação na corrente sanguínea da insulina, hormônio do crescimento e IGF-I (Newsholme *et al.*, 2005), causada pela rápida despolarização da membrana plasmática ligada ao transporte de aminoácidos com a cadeia lateral positiva.

De acordo com Le Floc'h *et al.* (2004), duas destas rotas do metabolismo da Arg são identificadas e conhecidas por ter efeitos imunomodulatórios diretos. A primeira, refere-se à Arg que se converte à ornitina e gera poliaminas que têm papel-chave na divisão celular, síntese de DNA e regulação do ciclo celular. A segunda corresponde à síntese do NO, um radical livre altamente reativo, permeável às células e membranas que participa de vários processos celulares, incluindo a neurotransmissão e a imunidade. Altas concentrações de NO podem ser induzidas por uma variedade de estímulos inflamatórios como os lipopolissacarídeos de bactérias e citocinas. Essa rota é essencial para a atividade citotóxica de macrófagos.

Humphrey *et al.* (2005) relataram que a captação de Arg e Lys, pelo fígado e pela bolsa cloacal durante a resposta de fase aguda do sistema imune, é intensificada para a síntese de proteínas de resposta da fase aguda, indicando que os componentes

dietéticos são essenciais para o desenvolvimento dos órgãos linfóides e para uma resposta imune efetiva.

Por outro lado, Deng *et al.* (2005) relatam que as pesquisas com aves são ainda muito esparsas e os resultados pouco consistentes. Kidd (2004), também, enfatiza a falta de resposta à suplementação de Arg quando são utilizados níveis próximos ao recomendado que apesar de elevar o nível de Arg plasmática, não melhoram a resposta imune humoral ou celular. Estes autores demonstraram efeitos benéficos da suplementação de Arg somente quando os níveis empregados variaram de 25 a 50% do requerimento estabelecido (NRC, 1994).

Deng *et al.* (2005), ainda, advertem que a suplementação de Arg por um período curto de tempo tem pouco efeito sobre a imunidade e que a imunocompetência pode ser permanentemente moldada pelo 'status' nutricional nos estágios mais precoces do desenvolvimento.

Tayade *et al.* (2006) demonstraram também que a resposta vacinal contra o vírus da doença de Gumboro de frangos suplementados com 2% de Arg foi 20% mais eficiente que a resposta induzida apenas pela vacina sem adição de Arg suplementar na dieta.

Outros autores obtiveram respostas positivas com a suplementação de Arg, no aumento da produção de NO por macrófagos (Sung *et al.*, 1991), na síndrome da hipertensão pulmonar (Wideman *et al.*, 1995), no peso dos órgãos linfóides (Kwak *et al.*, 1999), na função fagocítica dos monócitos e dos macrófagos durante o estresse por calor (Qureshi *et al.*, 2000), na redução da mortalidade de frangos desafiados com *Eimeria spp.* (Kidd *et al.*, 2001) e na redução de arranhões infectados em carcaças de frangos (Corzo *et al.*, 2003).

A Arg é considerada um aminoácido essencial para aves, principalmente na fase inicial, pelo fato de que o ciclo bioquímico da uréia não ser funcional em aves (Austic & Nesheim, 1971), as quais não podem sintetizar Arg 'de novo' e por isso são dependentes do fornecimento deste aminoácido nas dietas. Além disso, dietas a base de milho e farelo de soja representam um fator particularmente sensível na disponibilidade de Arg para frangos de corte. Arg é o quinto aminoácido limitante nestas dietas, após metionina + cistina, Lys, treonina e triptofano (Atencio *et al.*, 2004).

As aves têm o maior requerimento de Arg entre as espécies animais estudadas (Ball *et al.*, 2007). A explicação para esse alto requerimento é, além da falta de síntese endógena de Arg, a alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais

linhagens de corte, além da interação metabólica entre Lys e Arg pela relação antagônica existente entre esses aminoácidos (Edmonds *et al.*, 1987).

As concentrações teciduais de poliaminas, nas aves, parecem ser particularmente responsivas à manipulação dietética dos níveis de Arg. Devido à falta de um ciclo da uréia funcional, as aves dependem de uma fonte exógena de Arg para a formação de ornitina, que em mamíferos é obtida por meio do ácido glutâmico (Austic & Nesheim, 1971). A putrescina é formada pela descarboxilação da ornitina e a espermina e a espermidina são obtidas da putrescina na presença da S-adenosilmetionina descarboxilada, derivada da metionina, existindo, então a participação de ambos os aminoácidos, Arg e metionina. Estas aminas biogênicas são também consideradas de importância nutricional no crescimento e desenvolvimento do intestino do neonato (Quinn *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de Arg, na dieta inicial, sobre o desempenho produtivo, o desenvolvimento dos órgãos linfóides e a morfometria da mucosa intestinal de frangos corte.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Aviário da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR. Todos procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, tendo em vista que o ensaio experimental atendeu aos princípios éticos na experimentação animal, conforme preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 990 pintos de corte, Cobb, machos, provenientes de matrizes de 39 semanas de idade. As aves foram alojadas num galpão convencional de 30 ms de comprimento por 8 ms de largura, dividido em boxes de 5,2 m<sup>2</sup>, com cobertura de telha zincada, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado. Foi utilizada cama do tipo casca de arroz sobre o piso.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco níveis dietéticos de Arg digestível e seis repetições de 33 aves cada, totalizando 30 unidades experimentais.

Durante os primeiros dias, foram utilizados comedouros tubulares infantis e bebedouros, tipo copo de pressão, os quais foram substituídos, gradativamente, pelo comedouro tubular e bebedouro automático pendular. A ração e água foram fornecidas 'ad libitum' durante todo o período experimental.

O aquecimento inicial dos pintos foi utilizado lâmpadas infravermelhas, dispostas no centro do círculo de proteção. Foi utilizado um programa de iluminação contínua, durante a primeira semana e de 20 h de luz e quatro de escuridão diárias, até o abate.

A mortalidade e as causas, determinadas por necropsia, foram registradas e as aves mortas e as sobras de ração do box ao qual pertenciam, foram pesadas ao mesmo tempo, para ajustar o consumo de alimento e a conversão alimentar.

O programa nutricional foi dividido em duas fases: uma inicial (1 a 21 dias) e outra de crescimento e final (22 a 42 dias). Essas dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais propostas por Rostagno *et al.* (2000). Para obtenção dos níveis crescentes de Arg suplementar foi adicionado L-Arg (0, 100, 200, 300 e 400 mg/kg) à ração basal inicial em substituição ao inerte. Os níveis dietéticos corresponderam a 1,390; 1,490; 1,590; 1,690 e 1,790% de Arg digestível (Tabela 1), mantendo uma relação com a Lys de 1,103; 1,183; 1,262; 1,341 e 1,421%, respectivamente. A partir dos 22 dias de idade, todas as aves passaram a receber uma ração convencional para a fase de crescimento, com 19,7% de PB, 3150 EMA kcal/kg, 1,099% de Lys e 1,249% de Arg.

A composição química das dietas experimentais foi determinada pela metodologia descrita por Silva (1990) e o conteúdo de aminoácidos foi determinado pela da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Ao final de cada semana de criação (7, 14, 21 e 42 dias), todas as aves de cada unidade experimental e as sobras de ração foram pesadas para a determinação do ganho de peso corporal, consumo de alimento e conversão alimentar. Nestas mesmas idades, duas aves por unidade experimental (12 aves/tratamento) foram sacrificadas por deslocamento cervical. Após o sacrifício, as aves foram pesadas individualmente e as carcaças dessecadas para remoção dos órgãos linfóides (baço, bolsa cloacal e timo) e intestino delgado. O peso dos órgãos linfóides e o peso e comprimento do intestino delgado foram obtidos, imediatamente, após a dessecação e remoção dos tecidos exógenos.

Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias)

Ingredientes (%)	Arg digestível %				
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790
Milho	54,00	54,00	54,00	54,00	54,00
Óleo Soja	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Soja-Farelo 45%	37,94	37,94	37,94	37,94	37,94
Sal comum	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284
Bicarbonato de Sódio	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241
Calcário Calcítico 38%	0,796	0,796	0,796	0,796	0,796
Fosfato bicálcico 18%	1,923	1,923	1,923	1,923	1,923
DL-Metionina 98%	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296
L-Lys 78%	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246
L-Treonina 98%	0,117	0,117	0,117	0,117	0,117
L-Arg 99%	0	0,101	0,202	0,303	0,404
Inerte (caulim)	0,500	0,399	0,298	0,197	0,096
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Premix min. e vit. <sup>1,2</sup>	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
<b>Valores calculados</b>					
Proteína bruta %	22,4	22,4	22,4	22,4	22,4
EMA kcal/kg	3047	3047	3047	3047	3047
Cálcio %	0,920	0,920	0,920	0,920	0,920
Fósforo disponível %	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471
EMA kcal/kg	3047	3047	3047	3047	3047
Met. + cistina digestível %	0,890	0,890	0,890	0,890	0,890
Lys total %	1,383	1,383	1,383	1,383	1,383
Lys digestível %	1,260	1,260	1,260	1,260	1,260
Triptofano digestível %	0,252	0,252	0,252	0,252	0,252
Treonina digestível %	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
Arg total %	1,479	1,579	1,679	1,779	1,879
Arg digestível %	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790
Sódio %	0,220	0,220	0,220	0,220	0,220
Cloreto %	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200

<sup>1</sup>Mistura Vitamínica Inicial (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg; Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

<sup>2</sup>Mistura mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

Para a medida da área de tecido linfóide, a bolsa cloacal foi fixada em solução de Bouin para análise histológica, segundo processos descritos por Beçak (1976). As peças foram inclusas em parafina e levadas ao micrótomo rotativo para a realização dos cortes transversais no centro do órgão com cinco micrômetros de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Para o estudo morfométrico, as lâminas foram escaneadas, usando-se um “scanner HP ScanJet II v.2.5.”, sendo o “software” utilizado para o tratamento das imagens, o “Paint Shop Pro v.5.0”. A imagem foi digitalizada, brilho (variável entre 125 e 145), contraste 185 e escala de 800%. As imagens foram gravadas com extensão \*.jpg e levadas ao analisador de imagens. Para a

leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 5.2, da Mídia Cibertecnics.

Destas mesmas aves, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento do duodeno (a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal) e do jejuno (a partir da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel), os quais foram presos abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de Bouin por 24 h para análise histológica, segundo processos descritos por Beçak (1976). Cada fragmento foi submetido à cortes semi-seriados de 5  $\mu$ m de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Foi mensurada a altura de 20 vilos e a profundidade de 20 criptas de cada repetição por segmento e destes valores foi obtida a média.

Os dados foram submetidos à análise de regressão pela decomposição polinomial dos graus de liberdade, referentes aos níveis de Arg utilizando o Software SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 1997).

Os dados foram analisados, segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1A_i + b_2A_i^2 + b_3A_i^3 + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$ : observação da variável dependente na unidade experimental j submetida ao nível i de Arg, i: 1,2,3,4,5 (1=; 1,390%; 2= 1,490%; 3= 1,590%; 4= 1,690% e 5= 1,790%);

$b_0$ : constante;

$b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$ : são, respectivamente, coeficientes linear, quadrático e cúbico de regressão da variável dependente em função dos níveis de Arg;

$e_{ij}$ : erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ij}$

Os coeficientes de determinação foram calculados como percentagem da soma de quadrados do modelo em relação à soma de quadrados total.

## Resultados e Discussão

A análise do perfil de aminoácidos das rações experimentais apontou valor de Arg total cerca de 10% acima do valor calculado.

Os resultados referentes ao desempenho produtivo para os períodos de 1 a 7, 1 a 14, 1 a 21 e 1 a 42 dias de idade dos frangos de corte, são representados na Tabela 2. A mortalidade registrada, durante todo o período experimental, foi cerca de 1,5% e não foi influenciada ( $p>0,05$ ) pelos tratamentos experimentais.

Tabela 2. Médias e estimativas dos parâmetros de desempenho dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

	Arg digestível, %					CV (%)	efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
	Período de 1 a 7 dias						
Peso vivo, g	159,39	166,66	170,57	171,12	168,30	4,64	quadrático
Consumo de ração, g	131,20	137,14	135,39	134,50	132,65	5,43	NS
Conversão alimentar g/g	1,103	1,083	1,063	1,043	1,023	4,18	linear
	Período de 1 a 14 dias						
Peso vivo, g	431,29	438,29	434,96	449,80	438,55	2,75	NS
Consumo de ração, g	473,71	480,50	474,18	483,26	473,14	2,51	NS
Conversão alimentar, g/g	1,215	1,207	1,199	1,192	1,184	2,47	linear
	Período de 1 a 21 dias						
Peso vivo, g	861,15	865,68	870,20	874,73	879,26	2,15	linear
Consumo de ração, g	1086,12	1093,46	1077,62	1099,76	1079,49	2,08	NS
Conversão alimentar, g/g	1,328	1,319	1,311	1,303	1,295	1,09	linear
	Período de 1 a 42 dias						
Peso vivo, g	2483,15	2433,21	2437,56	2494,45	2398,87	3,69	NS
Consumo de ração, g	4028,40	3961,46	3928,15	4041,34	3838,88	5,16	NS
Conversão alimentar, g/g	1,660	1,636	1,638	1,636	1,643	4,31	NS

CV: coeficiente de variação; NS= ( $p>0,05$ )

A avaliação do desempenho produtivo das aves, na primeira semana, apontou efeito quadrático ( $p<0,05$ ) da suplementação de Arg sobre o peso vivo, com o maior valor no nível de 1,656% de Arg. A suplementação de Arg melhorou linearmente ( $p<0,05$ ) a conversão alimentar e não apresentou efeito ( $p>0,05$ ) para o consumo de ração (Figura 1).

Para o período de 1 a 14 dias, foi observado efeito ( $p<0,05$ ) apenas para a conversão alimentar, com melhora do índice em função do aumento dos níveis de Arg nas dietas (Figura 2). De 1 a 21 dias, porém, o peso vivo e a conversão alimentar apresentaram melhora linear ( $p<0,05$ ) de acordo com a suplementação de Arg, enquanto que o consumo de ração não foi afetado ( $p>0,05$ ) pelos tratamentos (Figura 3).

Para o período total, incluindo a fase de 22 a 42 dias, em que as aves não receberam suplementação dietética de Arg, não foi observado efeito ( $p>0,05$ ) sobre nenhum parâmetro produtivo.

O aumento da relação Arg:Lys propiciou melhor desempenho produtivo. De acordo com Marumatsu et al (1991), a eficiência de utilização de Arg pelas aves declina linearmente com o aumento dos níveis de Lys. Acima de 8g de Lys/kg da dieta, há uma perda de 20% na potência da Arg para um incremento de 4,9g de Lys/kg (1,25% de Lys). Se a relação Arg:Lys considerada de 105 deve ser mantida, como sugerido pela proteína ideal, o nível de Arg indicado na literatura de 1,31%, é insuficiente, assumindo eficiência de 80%, deveria ser de 1,64%.

No presente trabalho pode ser confirmado essas suposições. O nível de Lys foi mantido em 1,260% e o nível de Arg que maximizou o peso vivo das aves foi ao redor 1,650%, entretanto, para a melhora no índice de conversão alimentar foram necessários níveis um pouco mais elevados.

Mendes *et al.* (1997) e Brake *et al.* (1998), também, observaram melhor conversão alimentar à medida que a Arg foi adicionada às dietas dos frangos de corte. Já, Labadan et al (2001) apontaram necessidade maior de Arg para conversão alimentar do que para ganho de peso. Por outro lado, os níveis testados por estes e os demais autores consultados foram mais baixos que os utilizados neste experimento e as respostas obtidas também apresentaram algumas diferenças.

Burton & Waldroup (1997) encontraram exigência de Arg total de 1,40% em frangos de corte de 1 a 28 dias de idade, que receberam dieta com 21% de proteína bruta e Costa *et al.* (2001) utilizaram frangos de corte machos Ross de 22 a 42 dias de idade e sete relações Arg: Lys, variando de 95 a 132,5%, não observaram efeito do nível de Arg sobre as características de desempenho.

Chamruspollert *et al.* (2002) registraram exigência de Arg total de 1,26%, para ganho de peso, e de 1,27%, para conversão alimentar. Corzo & Kidd (2003) recomendam níveis ainda mais baixos, de 1,15% para ganho de peso e 1,28% para conversão alimentar na idade de 1 a 18 dias, mas o ganho de peso das aves foi muito baixo, em torno de 50% do registrado no presente experimento.

Atencio et al (2004) não observaram efeito sobre o consumo de ração, todavia, o ganho de peso e a conversão alimentar apresentaram respostas quadráticas, com níveis entre 1,10 a 1,39% de Arg digestível para a fase de 1 a 21 dias.

No presente experimento, o comportamento do consumo de ração também não foi modificado em nenhuma idade avaliada, indicando que as diferenças de ganho de peso podem ser atribuídas à eficiência de utilização das rações pelas aves e ao equilíbrio entre os aminoácidos essenciais e não essenciais. O crescimento consiste em parte, do resultado da síntese protéica, enquanto a eficiência de utilização é dependente não

somente da síntese protéica, mas também, da quantidade de aminoácidos sendo catabolizados (Sklan & Noy, 2004), já que este processo despende de energia para a biotransformação e eliminação.

A Arg pode ser o aminoácido limitante para que a ave expresse o seu máximo potencial de ganho de peso, por isso, o ajuste adequado do nível ótimo de Arg é fundamental.

O efeito positivo do aumento da relação Arg:Lys sobre o desempenho das aves pode estar relacionado com a alta temperatura observada durante o período experimental. Balnave & Brake (2002) relataram que, nestas condições, além de ocorrer redução na captação intestinal de Arg, ocorre maior degradação, demonstrando que o requerimento é aumentado. Exigência maior de Arg, em condições de altas temperaturas, pode estar relacionada com a produção de NO, um potente vasodilatador.

Outro fator que deve ter favorecido estes resultados foi a adição de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), nas rações experimentais que, de acordo com Balnave & Olívia (1991), fornece íons bicarbonato para tamponar o grupo guanidina da Arg utilizada em doses elevadas.

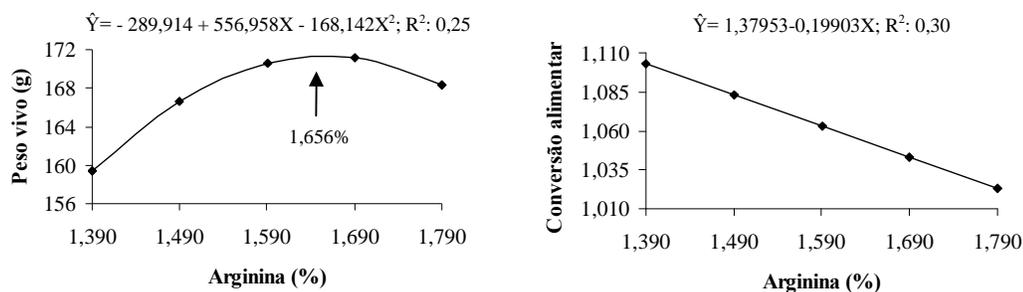


Figura 1. Peso vivo e conversão alimentar de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

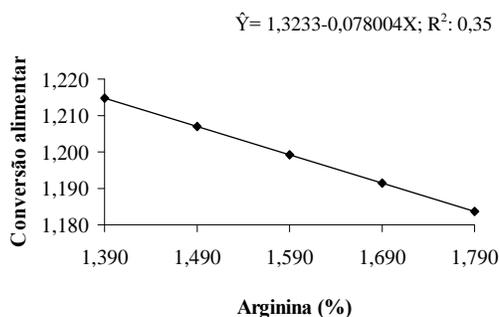


Figura 2. Conversão alimentar de frangos de corte aos 14 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

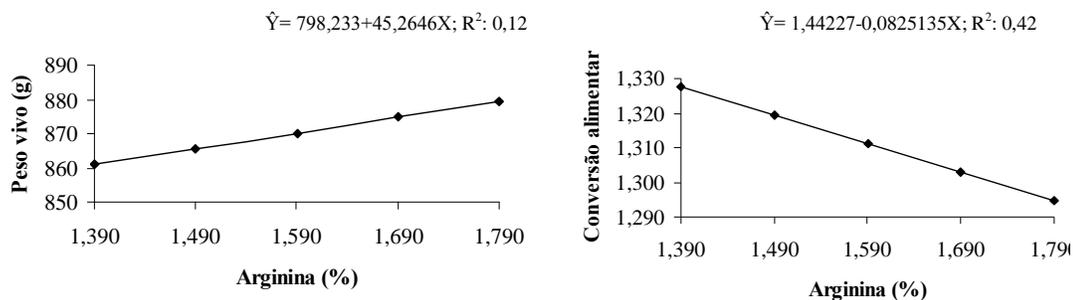


Figura 3. Peso vivo e conversão alimentar de frangos aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

Os resultados referentes ao peso dos órgãos linfóides e da área de tecido linfóide da bolsa cloacal aos 7, 14, 21 e 42 dias de idade dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg são representados nas Tabelas 3 e 4.

Aos 7 dias, o peso dos órgãos linfóides foi alterado ( $p < 0,05$ ) pela suplementação de Arg. O peso do timo e baço foi afetado de forma quadrática pela Arg, com valores máximos obtidos pelos níveis de 1,616 e 1,641%, respectivamente, enquanto o peso da bolsa cloacal aumentou linearmente ( $p < 0,05$ ) em função dos níveis dietéticos de Arg (Figura 4).

Aos 14 dias, apenas o peso do timo foi alterado de forma quadrática ( $p < 0,05$ ) pela suplementação de Arg, apontando exigência de 1,520% de Arg (Figura 5), enquanto que o peso dos demais órgãos não foi influenciado ( $p > 0,05$ ) pela adição de Arg.

Aos 21 dias, também, apenas o peso do timo foi afetado ( $p < 0,05$ ), mas de forma cúbica (Figura 5). Já, aos 42 dias, a suplementação de Arg, na fase inicial, não alterou ( $p > 0,05$ ) o peso dos órgãos linfóides.

A medida da área de tecido linfóide da bolsa cloacal apresentou um comportamento cúbico ( $p < 0,05$ ) em função dos níveis de Arg (Figura 6). Nas demais idades avaliadas, não houve efeito significativo ( $p > 0,05$ ).

É difícil a compreensão de um efeito biológico com comportamento cúbico, como foi o caso para o peso do timo aos 21 dias e da área de tecido linfóide da bolsa cloacal aos 7 dias. O peso do timo pode sofrer variação muito grande pela localização e constituição. O timo das aves consiste de duas fileiras de quatro a cinco lobos achatados e separados e situados de cada lado do pescoço da ave bem próxima à veia jugular, o que dificulta a colheita. Além disso, foi observada grande variação no peso dos órgãos

linfóides independente do peso vivo, a qual, possivelmente, se deve às diferenças intrínsecas relacionadas às respostas individuais das aves.

Tabela 3. Médias e estimativas dos pesos dos órgãos linfóides dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

	Arg digestível, %					CV (%)	Efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
	7 dias						
Peso do timo, g	0,568	0,687	0,716	0,623	0,703	18,91	quadrático
Peso do baço, g	0,180	0,201	0,211	0,209	0,189	13,40	quadrático
Peso da bolsa cloacal, g	0,294	0,306	0,317	0,329	0,340	17,24	linear
	14 dias						
Peso do timo, g	2,024	2,108	2,085	1,954	1,717	14,55	quadrático
Peso do baço, g	0,540	0,591	0,536	0,553	0,522	16,04	NS
Peso da bolsa cloacal, g	0,907	0,982	0,785	1,153	0,846	19,26	NS
	21 dias						
Peso do timo, g	6,026	5,708	6,255	6,689	6,033	14,32	cúbico
Peso do baço, g	1,042	1,100	1,158	1,018	1,070	13,80	NS
Peso da bolsa cloacal, g	1,925	2,099	1,862	2,262	1,818	23,86	NS
	42 dias						
Peso do timo, g	15,123	16,652	16,898	17,469	16,028	25,08	NS
Peso do baço, g	3,707	3,706	3,669	3,424	3,659	20,00	NS
Peso da bolsa cloacal, g	4,972	4,597	5,025	5,315	5,112	19,82	NS

CV: coeficiente de variação; NS= (p>0,05)

Tabela 4. Médias e estimativas da medida da área do tecido linfóide da bolsa cloacal (mm<sup>2</sup>) de frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Idade	Arg digestível, %					CV (%)	Efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
7 dias	26,62	28,13	25,57	24,17	29,19	15,57	cúbico
14 dias	52,61	53,91	49,11	63,10	48,44	52,61	NS
21 dias	90,35	96,85	101,26	103,59	103,84	21,02	NS
42 dias	174,75	165,69	173,11	195,42	187,6	18,60	NS

CV: coeficiente de variação; NS= (p>0,05)

O efeito da suplementação de Arg sobre o crescimento e o desenvolvimento dos órgãos linfóides foi mais evidente na primeira semana, concordando com Corzo & Kidd (2003) que atribuem à exigência maior em Arg, na fase inicial dos frangos de corte ao desenvolvimento do sistema imune. Todavia, este efeito pode ser por vários mecanismos. A Arg é um componente primário das proteínas e somente fornecido pela dieta já que não pode ser sintetizado ‘de novo’ pelo organismo das aves, um aumento na dieta disponibiliza mais Arg para a síntese protéica. A Arg estimula a liberação de

hormônios, como o hormônio do crescimento, insulina e glucagon, os quais podem aumentar a síntese protéica e a eficiência alimentar. Outro mecanismo inclui a formação de ornitina, um precursor das poliaminas que estão envolvidas na síntese de DNA e proliferação celular e ainda o aumento da formação de NO e alteração na liberação de citocinas (Kawak *et al.*, 1999; Le Floch *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005).

Neste contexto, não é possível esclarecer se os efeitos benéficos da suplementação de Arg, sobre o desenvolvimento dos órgãos linfóides, ocorreram por uma interação direta Arg-órgãos linfóides ou foram causados pelas alterações no 'status' neuroendócrino. O que pode ser observado é o comportamento distinto na resposta dos órgãos à suplementação. O timo, dos órgãos linfóides, foi o que mais respondeu em função do período de suplementação, ou seja, semanalmente durante toda fase inicial, o peso do timo foi positivamente correlacionado à suplementação de Arg. Basiouni *et al.* (2006) encontraram correlação significativa entre o peso do timo e o título de anticorpos de poedeiras, indicando que o tamanho do timo é um bom indicador da função imune.

O efeito no desenvolvimento dos órgãos linfóides foi apenas durante a fase inicial, em que houve adição de Arg. A partir dos 21 dias, foi fornecida ração basal isenta de suplementação, o que, provavelmente, alterou a biossíntese do NO. Este argumento é sustentado pelas observações de Oviedo-Rondón (2006) que alega que a disposição de Arg deve ser permanente porque o NO não pode ser armazenado, liberado ou inativado, após sua produção sináptica ou por células imunes.

A influência da Arg sobre o peso do timo, é compatível com os resultados obtidos em estudos com mamíferos jovens (Langkamp-Henken, 2000). Este efeito é de particular interesse, uma vez que o timo funciona como órgão linfóide primário, sendo imprescindível para a ontogenia de linfócitos T, células especializadas em reconhecer o antígeno para que a resposta humoral seja desenvolvida. Ainda, segundo Abdukalykova & Ruiz-Feria (2006), níveis adicionais de Arg podem acelerar a produção de anticorpos em frangos de corte.

Segundo Tayade *et al.* (2006), a proteção não específica observada, em aves vacinadas e suplementadas com Arg, é atribuída à ação estimulatória sobre diferentes componentes do sistema imune, principalmente sobre a imunidade mediada por células e a atividade citotóxica dos macrófagos por meio da síntese de NO.

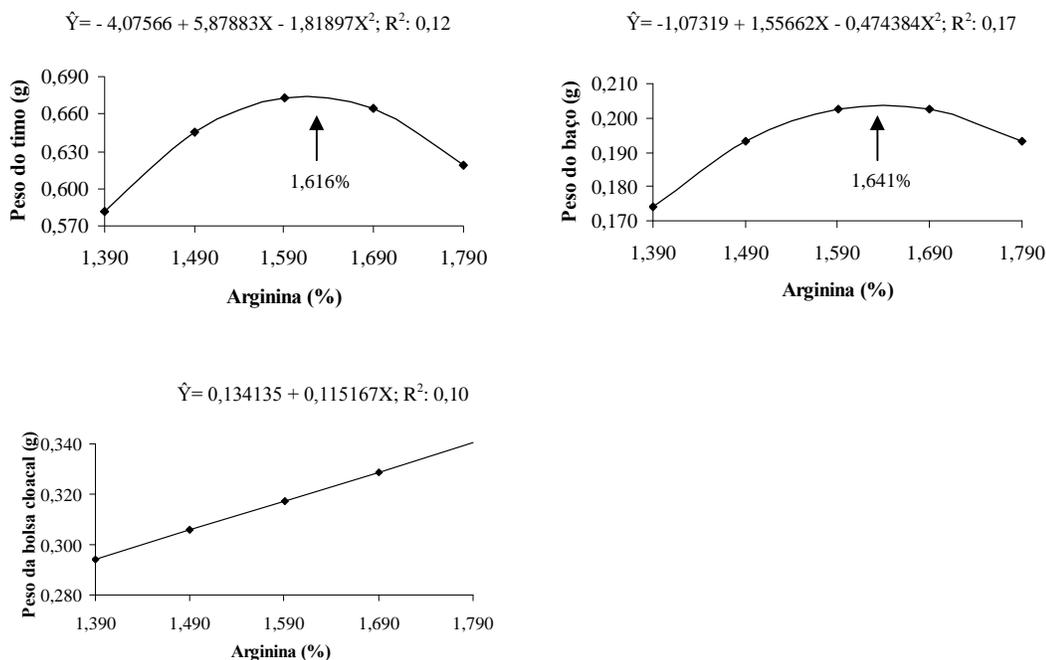


Figura 4. Peso dos órgãos linfóides de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

As melhores respostas aos níveis de Arg, encontrados neste trabalho, suportam as constatações de Kidd (2004) que obtiveram efeitos benéficos quando os níveis de Arg variaram de 25 a 50% acima da exigência. No presente estudo, um nível aproximado de 1,50% de Arg digestível promoveu o melhor desenvolvimento dos órgãos, que corresponde a cerca de 20% acima do nível estabelecido.

Esta exigência mais baixa de Arg, para o desenvolvimento dos órgãos linfóides, em comparação ao citado pela literatura, pode ser pela falta de estímulos antigênicos durante o período experimental. As aves não foram desafiadas imunologicamente, nem por vacinas ou endotoxinas, além do ambiente de criação que era isento de qualquer desafio, uma vez que foi o primeiro experimento desenvolvido neste aviário experimental.

Por outro lado, discordam dos resultados de Kawak *et al.* (1999) e Kidd *et al.* (2002) que não observaram efeito da suplementação de Arg acima do nível recomendado. Estes autores consideram que o desenvolvimento dos órgãos linfóides é mais afetado pela deficiência de Arg. De Jonge *et al.* (2002) demonstraram que a redução em torno de 30 a 40% do nível de Arg plasmática prejudicou o desenvolvimento dos órgãos linfóides de ratos no período neonatal.

Estes resultados são indicativos de que apenas em situações de ativação do sistema imune, a suplementação de Arg, em níveis mais elevados, pode ser necessária para sustentar uma adequada imunocompetência.

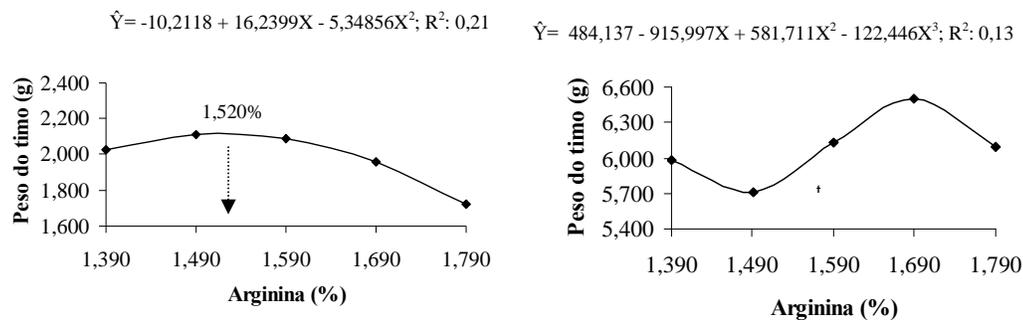


Figura 5. Peso do timo dos frangos de corte aos 14 e 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

O aumento da área de tecido linfóide da bolsa cloacal, observado aos 7 dias, demonstra o efeito imunomodulador da Arg. O lúmen interno da bolsa é delimitado por “prolongamentos” de tecido epitelial que forma pregas de diferentes tamanhos e é onde ocorre a formação dos folículos linfóides, que, segundo Montassier (2000), se constituem nas principais estruturas onde ocorrem fases importantes do desenvolvimento dos linfócitos B em células imunocompetentes maduras e funcionais. Este resultado se reveste de importância, quando confrontado com as investigações de LeBien (2002), as quais mostraram que a Arg é requerida para diferenciação de pró-linfócitos B em pré-linfócitos B, na medula óssea, e está envolvida na liberação destas células da medula.

Diversamente a este processo em mamíferos, nas aves, a bolsa cloacal é o local onde ocorre este processo de amadurecimento dos linfócitos B, porém, não há estudos desta natureza que possam confirmar esse efeito da Arg nas aves.

Por outro lado, a resposta imune humoral das aves pode ser afetada pela suplementação de Arg apenas em longo prazo. Deng et al (2005) observaram aumento no título de anticorpos contra hemáceas de carneiro, somente após quatro semanas do fim da suplementação de Arg na dieta de frangas de postura.

$$\hat{Y} = -2336,46 + 4590,94X - 2959,01X^2 + 632,661X^3; R^2: 0,18$$

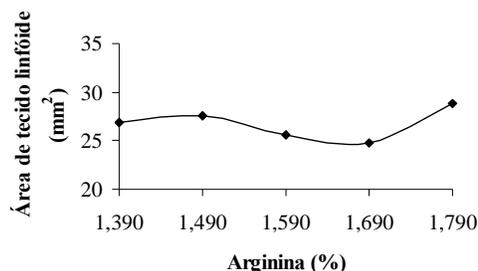


Figura 6. Medida da área de tecido linfóide da bolsa cloacal dos frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

Os resultados referentes ao peso e comprimento do intestino delgado e as medidas da altura dos vilos, profundidade das criptas e relação vilo:cripta dos segmentos do intestino delgado, duodeno e jejuno dos frangos de corte, aos 7, 14, 21 e 42 dias de idade, alimentados com diferentes níveis de Arg suplementar estão representados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Médias dos valores de peso e comprimento do intestino delgado dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

Intestino delgado	Arg digestível, %					CV (%)	efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
	7 dias						
Peso, g	16,43	16,48	16,37	16,95	16,80	8,74	NS
Comprimento, cm	92,83	96,00	96,50	93,83	93,42	7,31	NS
	14 dias						
Peso, g	35,07	31,54	32,87	33,79	30,65	14,34	NS
Comprimento, cm	121,42	121,83	121,00	122,58	121,92	5,56	NS
	21 dias						
Peso, g	53,75	50,92	55,06	56,62	49,19	18,17	NS
Comprimento, cm	140,75	145,83	135,50	143,00	141,00	11,63	NS
	42 dias						
Peso, g	118,17	122,85	122,31	137,95	122,03	20,42	NS
Comprimento, cm	191,17	189,25	187,33	198,08	187,00	8,23	NS

CV: coeficiente de variação; NS= (p>0,05)

Não houve efeito (p>0,05) da suplementação de Arg sobre o peso e comprimento do intestino delgado em nenhuma idade avaliada.

A morfometria da mucosa do duodeno e jejuno dos frangos de corte aos 7 dias de idade foi influenciada de forma quadrática (p<0,05) pelos níveis de Arg, apenas na relação vilo:cripta do duodeno e em relação à profundidade de cripta do jejuno,

entretanto com comportamentos opostos. De acordo com as equações ajustadas, maior relação vilos:cripta foi obtida com incrementos de 1,595% de Arg, por outro lado, a menor profundidade das criptas foi observada para este mesmo nível de suplementação (Figura 7).

Tabela 6. Médias e estimativas dos valores das medidas morfométricas da mucosa do intestino delgado (duodeno e jejuno) dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

	Arg, %					CV (%)	efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
7 dias							
<i>Duodeno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	629,26	581,23	638,18	641,93	599,66	13,70	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	114,39	106,04	103,09	105,52	113,35	12,11	quadrático
Relação vilos:cripta	5,40	5,95	6,14	5,96	5,42	13,39	quadrático
<i>Jejuno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	285,33	283,20	317,25	275,77	299,12	21,03	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	74,33	79,05	78,87	81,69	72,36	15,08	NS
Relação vilos:cripta	3,87	3,65	4,06	3,46	3,74	18,13	NS
14 dias							
<i>Duodeno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	746,25	732,71	728,57	754,17	760,33	11,22	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	102,87	112,78	105,00	106,87	103,02	18,88	NS
Relação vilos:cripta	7,40	6,58	6,97	7,23	7,56	12,62	NS
<i>Jejuno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	406,17	388,76	388,11	404,21	437,06	10,22	quadrático
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	80,35	80,89	74,81	86,38	75,04	18,73	NS
Relação vilos:cripta	5,17	4,77	5,56	4,82	5,89	20,85	NS
21 dias							
<i>Duodeno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	1016,78	934,98	1030,02	1038,10	1023,61	11,09	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	117,70	114,45	118,44	118,75	126,17	11,75	NS
Relação vilos:cripta	8,67	8,32	8,67	8,77	8,17	8,67	NS
<i>Jejuno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	606,78	565,21	600,10	574,56	639,81	13,69	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	107,03	109,54	106,28	102,63	110,82	15,63	NS
Relação vilos:cripta	5,72	5,19	5,84	5,89	5,88	12,77	NS
42 dias							
<i>Duodeno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	1046,16	1042,06	1078,65	1043,17	1125,33	10,36	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	139,68	129,12	126,24	131,02	143,47	13,74	quadrático
Relação vilos:cripta	7,42	8,68	8,66	7,73	8,02	15,82	NS
<i>Jejuno</i>							
Altura de vilos, $\mu\text{m}$	700,97	737,22	693,44	736,87	711,27	13,27	NS
Profundidade de cripta, $\mu\text{m}$	114,49	116,40	114,92	108,56	110,48	12,27	NS
Relação vilos:cripta	6,20	6,39	6,12	6,86	6,50	15,50	NS

CV: coeficiente de variação; NS= ( $p>0,05$ )

O mesmo efeito positivo da suplementação de Arg sobre a relação vilos:cripta do duodeno foi observado para o peso vivo das aves aos 7 dias, mostrando haver

envolvimento da suplementação de Arg no desenvolvimento da mucosa do duodeno que pode ser associado ao melhor desempenho observado nesta idade.

Aos 14 dias de idade, apenas a altura dos vilos do jejuno apresentou comportamento quadrático ( $p < 0,05$ ) em relação à suplementação de Arg, sendo que o nível de 1,544% foi associado ao menor valor para esse parâmetro (Figura 8), enquanto aos 21 dias, não houve diferença na morfometria da mucosa para nenhum segmento intestinal estudado.

Apesar dos frangos não receberem dietas suplementadas pela Arg, a partir dos 21 dias de idade, foi observado efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) sobre a profundidade das criptas da mucosa duodenal aos 42 dias de idade, a exemplo do observado aos 7 dias de idade.

A altura dos vilos pode ser correlacionada positivamente com o ganho de peso corporal e o consumo de ração (Kelly *et al.*, 1991), todavia, este efeito não foi observado. Houve melhor ganho de peso e conversão alimentar associados com a suplementação de Arg, contudo não houve correlação com os resultados obtidos na morfometria intestinal.

A Arg está envolvida na síntese das poliaminas que, por sua vez, estão associadas com a divisão celular, síntese protéica e crescimento tecidual (Seiler, 1992 citado por Gonzalez-Esquerria & Leeson, 2006), além de consideradas de importância nutricional no crescimento e desenvolvimento do intestino do neonato (Quinn *et al.*, 2002). Mas, para que a Arg possa ser utilizada para a síntese das poliaminas, precisa ser hidrolisada para uréia e ornitina pela arginase. (Meijer, *et al.*, 1990; Wu & Morris, 1998), já que as aves não sintetizam ornitina como as espécies ureotélicas.

Entretanto, a *upregulation* da arginase pela elevação da Arg ou da Lys dietética, pode levar a elevadas concentrações de ornitina e inibir a atividade da ornitina descarboxilase, enzima envolvida na geração das poliaminas, pela rápida formação e acúmulo da putrescina (Dircks *et al.*, 1986). Assim, é provável que quando não há um requerimento aumentado de Arg, tanto para a síntese protéica quanto para a síntese de precursores, não é esperado nenhum efeito benéfico da Arg sobre o desenvolvimento intestinal.

Além disso, Ruiz-Feria *et al.* (2001) questionam que pode haver diferença entre linhagens de frangos de corte ou até dentro das linhagens com relação à atividade da arginase renal, com controle mais efetivo sobre a síntese de poliaminas e,

conseqüentemente, a suplementação de Arg poderia resultar em efeito trófico sobre a mucosa intestinal.

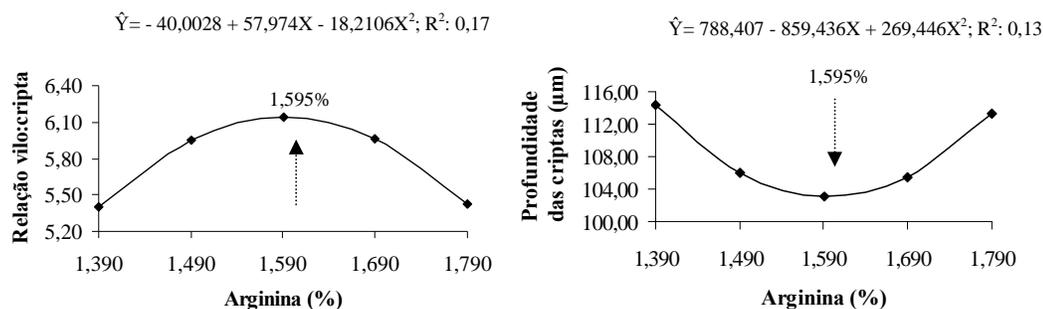


Figura 7. Relação vilos:cripta e profundidade das criptas do duodeno dos frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

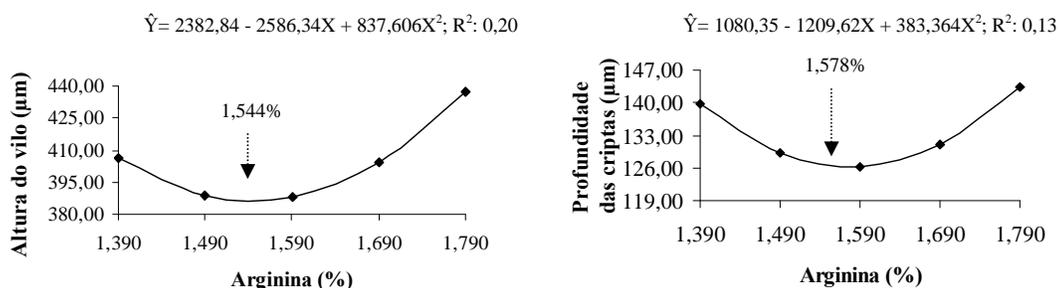


Figura 8. Altura dos vilos do jejuno e profundidade das criptas do duodeno dos frangos de corte aos 14 e 42 dias alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

## Conclusão

A suplementação de Arg, acima das exigências nas rações iniciais dos frangos de corte, melhorou o desempenho produtivo e o desenvolvimento dos órgãos linfóides, entretanto este efeito foi transitório, não havendo diferença nestas características na idade de abate. Este estudo sugere efeito mais pronunciado da Arg sobre o peso do timo do que do baço ou da bolsa cloacal.

A participação da Arg, no desenvolvimento da mucosa intestinal, deve-se, provavelmente, ao aumento dos níveis de ornitina disponíveis para a síntese de poliaminas.

Adicionalmente, estudos mais completos a cerca dos mecanismos celulares envolvidos na interação da Arg com o sistema imune serão necessários para estabelecer a aplicabilidade da suplementação dietética na otimização da resposta imune. Devido ao aumento da disponibilidade comercial para a suplementação de dietas, os aminoácidos

deverão se constituir em efetivos nutracêuticos na prevenção de doenças e manutenção da sanidade das aves.

### Referências

Abdukalykova S, Ruiz-Fria C. Arginine and vitamin E improve the cellular and humoral immune response of broiler chickens. *International Journal Poultry Science* 2006; 5( ):121-7.

Atencio A, Albino LFT, Rostagno HS, Oliveira DC, Vieites FM, Pupa JMR. Exigência de arginina digestível para frangos de corte machos em diferentes fases. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2004; 33(6):1456-66.

Austic RE, Nesheim MC. Arginine, ornithine and proline metabolism of chicks: Influence of diet and heredity. *Journal of Nutrition* 1971; 101(10):1403-13.

Austic RE, Scott RL. Involvement of food intake in the lysine-arginine antagonism in chicks. *Journal of Nutrition* 1975; 105(9):1122-31.

Ball RO., Urschel, KL, Pencharz, PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *Journal of Nutrition* 2007; 137(6):1626-1641.

Balnave D, Olivia AG. The influence of sodium bicarbonate and sulfur amino acids on the performance of broilers at moderate and high temperatures. *Australian Journal of Agricultural Research* 1991; 42:1385-97.

Basiouni G, Najib H, Zaki MM, L-Ankari AS. Influence of extra supplementation with arginine and lysine on overall performance, ovarian activities and humoral immune response in local saudi hens. *International Journal of Poultry Science* 2006; 5(5):441-8.

Beçak WPJ. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos S.A., 1976.

Brake J, Balnave D, Dibner JJ. Optimum dietary arginine:lysine ratio for broiler chickens is altered during heat stress in association with changes in intestinal uptake and dietary sodium chloride. *British Poultry Science* 1998; 39( )639-47.

Burton EM, Waldroup P. Arginine and lysine needs of young broiler chicks. *Nutrition International* 1997; 19(4):607-14.

Chamruspollert M, Pesti GM, Bakalli RI. Dietary interrelationships among arginine, methionine, and lysine in young broiler chicks. *British Journal of Nutrition* 2002; 88:655-60.

Corzo A, Moran Jr ET, Hoehler D. Arginine Need of Heavy Broiler Males: Applying the Ideal Protein Concept. *Poultry Science* 2003; 82(3):402-7.

Corzo A, Kidd MT. Arginine needs for chick and growing broiler. *International Journal Poultry Science* 2003; 2( ):379-82.

Costa FGP, Rostagno HS, Toledo, RS, Albino LFT. Efeito da relação arginina:lisina sobre o desempenho e qualidade de carcaça de frangos de corte de 3 a 6 semanas de idade, em condições de alta temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001; 30(6):2021-25.

De Jonge WJ, Kwijkers KL, Te Velde AA, Van Deventer SJH, Nolte MA, Mebius RE, Ruijter JM, Lamers MC, Lamers WH. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *Journal Clinical Investigation* 2002; 110(10):1539-48.

Deng K, Wong CW, Nolan JV. Long-term effects of early life L-arginine supplementation on growth performance, lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. *British Poultry Science* 2005; 46:318-24.

Dircks L, Grens A, Slezynger TC, Schleffer IO. Posttranslational regulation of ornithine decarboxylase activity. *Cellular Physiology* 1986;126:371-378.

Edmonds MS, Baker DH. Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick. *Journal of Animal Science* 1987; 65(3):699-705.

Hunphrey BD, Kirk KC. The acute phase response alters cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2005; 142:485-94.

Kell D, Smith JA, Mccracken KJ. Digestive development of the early weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *British Journal Nutrition* 1991; 65:169-80.

Kennedy JA, Kirk SJ, Mccrory DC, Halliday MI, Barclay GR, Rowlands, BJ. Modulation of immune function and weight loss by L-arginine in obstructive jaundice in the rat. *British Journal of Surgery* 1994; 819:1199-1201.

Kidd MT, Peebles ED, Whitmarsh SK, Yeatman JB, Wideman Jr RF. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. *Poultry Science* 2001, 80(11):1535-42.

Kidd MT. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science* 2004; 83(4):650-57.

Kobayashi T, Yamamoto M, Hiroi T, Mcghee J, Takeshita Y, Kiyono H. Arginine enhances induction of T helper 1 and T helper 2 cytokine synthesis by Peyer's patch alpha beta T cells and antigen-specific mucosal immune response. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1998; 62:2334-40.

Kwak H, Austic RE, Dietert RR. Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. *Poultry Science* 1999; 78(11):1536-41.

Labadan Jr MC, Hsu KN, Austic RE. Lysine and arginine requirements of broiler chickens at two to three weeks intervals to eight weeks of age. *Poultry Science* 2001; 80(5):599-606.

Le Floc'h N, Melchior D, Obled C. Modification of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Science* 2004; 87(1-2):37-45.

Lebien TW. Arginine: an unusual dietary requirement of pre-B lymphocytes? *The Journal of Clinical Investigation* 2002; 110:1411-13.

Lewis B, Langkamp-Henken B. Arginine enhances in vivo immune responses in young, adult and aged mice. *Journal of Nutrition* 2000; 130(7):1827-30.

Marumatsu TH, Ohshima H, Goto M, Mori S, Okumura J. Growth prediction of young chicks. Do equal deficiencies of different essential amino acids produce equal responses? *British Poultry Science* 1991; 32:139-49.

Meijer AJ, Lamers WH, and Chamuleau AFM. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews* 1990; 70(3):701-748.

Mendes AA, Watkins SE, England JA. Influence of dietary lysine levels and arginine:lysine ratios on performance of broilers exposed to heat or cold stress during the period of three to six weeks of age. *Poultry Science* 1997; 76(3):472-81.

Montassier HJ. Enfermidades do sistema imune. In: Berchieri JrA, Macari M, editores Doenças das aves. Campinas: FACTA; 2000. p.134-150.

Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clinical Science* 2005; 108:185-194.

NRC. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry. 8<sup>th</sup> rev. ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Oviedo EO, Ferket PR. Nutritional factors that affect leg problems in meat poultry: A Review. In: Ferket PR, editor. Proceedings of the 32nd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference; 2005; North Carolina: Carolina Feed Industry Association in Cooperation with NC State University; 2005. p.58.

Quinn PRO, Knabe DA, Wu G. Arginine catabolism in lactating porcine mammary tissue. *Journal of Animal Science* 2002; 80(2):467-74.

Qureshi MA, Brake J, Balnave D. and Kidd MT. Effect of environmental temperature and arginine:lysine ratio on broiler macrophage and monocyte function. *Poultry Science* 2000; 79(1):64.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2000. 141p.

Ruiz-Feria CA, Kidd MT, Wideman, RF. Plasma Levels of Arginine, Ornithine, and Urea and Growth Performance of Broilers Fed Supplemental L-Arginine During Cool Temperature Exposure. *Poultry Science* 2001; 80(3):358–69.

Sklan D, Noy Y. Catabolism and deposition of amino acids in growing chicks: effect of dietary supply. *Poultry Science* 2004; 83(6):952-61.

Sung YJ, Hotchkiss JH, Austic RE, Dietert RR. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *Journal of Leukocyte Biology* 1991; 50:49-56.

Tayade C, Jaiswal TN, Mishra SC, Madhuri K. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. *Vaccine* 2006; 24:552–60.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG; sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário. Versão 7.1. Viçosa, 1997. 150p.

Widemann RF, Kirby JR, Ismail IK, Bottje M, Moore WG, Valderman RC. Supplemental L-arginine attenuates pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers. *Poultry Science* 1995; 74(2):323-30.

Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* 1998; 336:1–17.

**VI – Efeito da Suplementação de Arginina na Dieta Inicial sobre o Desenvolvimento do Músculo Peitoral, Diâmetro e Relação Proteína:DNA das Fibras Musculares Esqueléticas dos Frangos de Corte**

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de arginina (Arg) na dieta inicial sobre o desenvolvimento muscular de frangos de corte e a ativação das células satélite e agregação de proteína miofibrilar. Foram utilizados 990 pintos de corte, Cobb, machos, os quais foram alocados aleatoriamente de acordo com delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições de 33 aves cada. Os tratamentos consistiram de uma dieta basal com 1,390% de Arg digestível (sem suplementação) e quatro níveis dietéticos (1,490%; 1,590%; 1,690% e 1,790%), mantendo relação com a Lys de 1,103; 1,183; 1,262; 1,341 e 1,421%, respectivamente. Houve efeito positivo ( $p < 0,05$ ) da suplementação de Arg no peso do peito e filé e no diâmetro das fibras musculares, entretanto não foi observado efeito ( $p > 0,05$ ) sobre a relação proteína/DNA, demonstrando que a Arg não interferiu na atividade mitótica das células satélite, via sua ação estimulatória sobre a secreção de IGF-I. Todavia, independente deste mecanismo, a Arg afetou positivamente o crescimento muscular na fase inicial. Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) da suplementação de Arg na fase inicial sobre o rendimento da carcaça dos frangos de corte aos 42 dias. A suplementação de Arg acima dos níveis, atualmente, recomendados para a fase de crescimento pode ser necessária no desenvolvimento muscular dos frangos de corte.

Palavras-chave: IGF-I, células satélite, peso do filé, relação proteína:DNA

## **VI – Effect of Arginine Supplementation in the Initial Diet on Development Breast Muscle, Diameter and Protein:DNA Ratio of Broiler Chickens’ Skeletal Muscle Fibers**

**ABSTRACT:** Research studied the effect arginine (Arg) supplementation during the initial diet for broiler chicken on muscle development and activation of the satellite cell and protein myofiber accretion. Nine hundred and ninety male Cobb broilers were reared in a complete randomized design with five treatments and six replicates of 33 birds each. Dietary treatments consisted of one basal diet (Arg not supplemented) and four supplemental digestible Arg levels (1.390%; 1.490%; 1.590%; 1.690% and 1.790%), maintaining a relationship with Lys of 1.103; 1.183; 1.262; 1.341 and 1.421%, respectively. There was a positive effect ( $p < 0.05$ ) of dietary Arg supplementation on weight breast, breast fillet weight and diameter skeletal muscle fibers. There was, however, no significant effect on protein:DNA ratio at any age. This fact suggested that Arg levels did not activate the satellite cells via IGF-I. On the other hand, dietary Arg supplementation resulted in improvements in breast growth of chicks at the end of the initial phase. There was no effect ( $p > 0.05$ ) of dietary Arg supplementation in the initial phase on the carcass yield on the 42<sup>nd</sup> day. Dietary Arg supplementation above currently recommended levels for growth phase may be necessary for the broiler chickens’ muscular development.

**Key words:** amino acid, IGF-I, satellite cells, breast fillet weight, protein:DNA ratio.

## Introdução

O crescimento muscular pós-nascimento é dependente da hipertrofia muscular, já que na eclosão, as fibras musculares das aves já estão formadas (Smith, 1963). As células musculares são multinucleadas e a síntese protéica em nível destas miofibras é dependente da quantidade de DNA (ácido desoxirribonucléico) presente nestes núcleos. Apesar dos núcleos serem pós-mitóticos, observa-se aumento significativo de DNA muscular durante o crescimento pós-eclosão. O aumento do DNA muscular é decorrente da atividade das células satélite precursoras miogênicas presentes na musculatura esquelética que iniciam seu desenvolvimento durante a última fase embrionária, sendo capazes de proliferar, diferenciar e juntar-se às fibras já existentes, ou fundirem-se com outras, para formar novas fibras (Moss, 1968). As células satélite são responsáveis por todos núcleos de geração secundária nas miofibras (Bischoff, 1975). Este processo é responsável por cerca de 98% do conteúdo final de DNA da miofibras, o que permite a manutenção do volume citoplasmático e o número de mionúcleos e, portanto, o aumento da capacidade de síntese protéica (Halevy *et al.*, 2003; Duclos *et al.*, 2005).

No momento da eclosão, há elevado número de células satélite que com o início do crescimento decrescem de forma acentuada, permanecendo em repouso, sendo reativadas somente em caso de lesão muscular (Pavlath, 1996 citado por Hawke & Garry, 2001).

A disponibilidade de alimentos após a eclosão dos pintinhos é condição primordial para estímulo à proliferação de células satélite e sua incorporação às fibras musculares, propiciando máximo crescimento muscular (Uni & Ferket, 2004)

Neste sentido, a nutrição pós-eclosão das linhagens de alto rendimento tem recebido considerável atenção pela importância no desenvolvimento da capacidade máxima de deposição protéica e crescimento muscular. Por isso, a estratégia nutricional empregada na maximização do desempenho das aves nos primeiros dias de vida não deve se restringir unicamente ao ganho de peso, mas deve ter uma concepção que inclua maiores ganhos em rendimento de músculo.

A Arg, além de constituinte de proteínas, ainda, está envolvida na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas (Bolea *et al.*, 1997) e do hormônio do crescimento (GH) (Merimee *et al.*, 1969), cujos efeitos se manifestam por meio da secreção secundária dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFI e II) (Roith *et al.*, 2001). O IGF-I é conhecido por incitar numerosos efeitos anabólicos no metabolismo

do músculo esquelético, como a proliferação e diferenciação das células satélite (Florini *et al.*, 1996) e a agregação de proteína miofibrilar pela combinação dos efeitos sobre a síntese e a degradação protéica (Duclos *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1995, Duclos *et al.*, 2005).

A Arg é considerada um aminoácido essencial para aves, principalmente, na fase inicial, pelo fato do ciclo bioquímico da uréia não ser funcional em aves, as quais não podem sintetizar Arg, e por isso são dependentes do fornecimento deste aminoácido nas dietas.

A exigência de Arg pelas aves é a mais alta entre as espécies animais estudadas (Ball *et al.*, 2007). A explicação para essa alta exigência é, além da falta de síntese endógena, a alta taxa de deposição protéica pelo rápido crescimento das atuais linhagens de corte, além da interação metabólica entre Lys e Arg pela relação antagônica existente entre esses aminoácidos (Edmonds *et al.*, 1987). Níveis elevados de Lys promovem expressiva elevação da atividade da arginase renal e conseqüentemente induzem à degradação da Arg (Austic & Scott, 1975).

Com os constantes avanços tecnológicos obtidos e a utilização de aves altamente especializadas com grande potencial genético direcionado para o crescimento, é comum a suplementação de Lys nas dietas acima dos requerimentos nutricionais (Nascimento, 2003). O aumento na concentração de Lys, nas dietas, favorece a síntese protéica levando a maior rendimento de peito, tendo em vista que este é um aminoácido de alta proporção na proteína animal (Acar *et al.*, 1991).

Apesar de as evidências existentes sobre a participação da Arg na secreção do IGF, o seu real papel na regulação do desenvolvimento muscular das aves, principalmente, em relação às linhagens de corte que passam por rápido período de crescimento num curto espaço de tempo, não foi ainda esclarecido.

O conhecimento fisiológico e bioquímico de como ocorre a deposição de tecido muscular é uma ferramenta muito importante para a manipulação do crescimento.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de Arg, na dieta inicial de frangos de corte, sobre o desenvolvimento muscular de frangos de corte e a ativação das células satélite e agregação de proteína miofibrilar.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Aviário da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR. Todos procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, tendo em vista que o ensaio experimental atendeu aos princípios éticos na experimentação animal, conforme preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 990 pintos de corte, Cobb, machos, provenientes de matrizes de 39 semanas de idade. As aves foram alojadas num galpão convencional de 30 ms de comprimento por oito metros de largura, dividido em boxes de 5,2 m<sup>2</sup>, com cobertura de telha zincada, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado. Foi utilizada cama do tipo casca de arroz sobre o piso.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco níveis dietéticos de Arg digestível e seis repetições de 33 aves cada, totalizando 30 unidades experimentais.

Durante os primeiros dias, foram utilizados comedouros tubulares infantis e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos, gradativamente pelo comedouro tubular e bebedouro automático pendular. A ração e água foram fornecidas 'ad libitum' durante todo o período experimental.

O aquecimento inicial dos pintos foi utilizado lâmpadas infravermelhas, dispostas no centro do círculo de proteção. Foi utilizado um programa de iluminação contínua durante a primeira semana e de 20 h de luz e quatro de escuridão diárias até o abate.

A mortalidade e as causas, determinadas por necropsia, foram registradas e as aves mortas e as sobras de ração do box, ao qual pertenciam, foram pesadas ao mesmo tempo para ajustar o consumo de alimento e a conversão alimentar.

O programa nutricional foi dividido em duas fases, uma inicial (1 a 21 dias) e outra de crescimento e final (22 a 42 dias). Essas dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais propostas por Rostagno *et al.* (2000). Para obtenção dos níveis crescentes de Arg suplementar, foi adicionado L-Arg (0, 100, 200, 300 e 400

mg/kg) à ração basal inicial em substituição ao inerte. Os níveis dietéticos corresponderam a 1,390; 1,490; 1,590; 1,690 e 1,790% de Arg digestível (Tabela 1), mantendo relação com a Lys de 1,103; 1,183; 1,262; 1,341 e 1,421%, respectivamente. A partir dos 22 dias de idade, todas as aves passaram a receber ração convencional para a fase de crescimento, com 19,7% de PB, 3150 EMA kcal/kg, 1,099% de Lys e 1,249% de Arg.

A composição química das dietas experimentais foi determinada pela metodologia descrita por Silva (1990) e o conteúdo de aminoácidos foi determinado pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Aos 7, 14, 21 e 42 dias de idade, duas aves por unidade experimental (12 aves/tratamento) foram sacrificadas por deslocamento cervical. Após o sacrifício, as aves foram pesadas individualmente e retirado o peito e pesado. O músculo *Pectoralis major* esquerdo foi extraído, pesado e, com o uso do paquímetro digital, foi medida a espessura (mm) e com auxílio de uma régua (cm) o comprimento e largura dos filés.

Após a colheita, duas amostras do músculo *Pectoralis major* direito por unidade experimental (12 amostras/tratamento) foram mantidas à temperatura ambiente durante 15 minutos (Khan, 1977). Depois de aparadas e reduzidas a fragmentos de aproximadamente 1 cm x 0,5 cm, as amostras foram identificadas, congeladas e armazenadas em botijão, contendo nitrogênio líquido até o processamento. Para o processamento do material colhido, os segmentos musculares foram transferidos para a câmara do criostato, utilizando-se para isto o adesivo OCT *Tissue TK*. Os segmentos foram orientados para a obtenção de cortes transversais das fibras, com oito micras de espessura e submetidos à coloração de Hematoxilina–Eosina para a avaliação da morfologia geral do tecido estudado e mensuração do diâmetro das fibras. A captura de imagens para análise morfométrica foi realizada por meio de câmera digital de alta resolução PRO SERIES da Mídia Cibertecnicos, acoplada ao microscópio Olympus Bx 40. Para a leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 5.2, da Mídia Cibertecnicos.

Foram capturadas 10 imagens do tecido muscular, por ave avaliada, com ampliação final equivalente a ocular 10X e objetiva 10X. Foram mensuradas 20 fibras musculares em cada imagem, utilizando-se para isso o método do menor diâmetro, conforme Dubowitz (1985), totalizando 200 fibras musculares por ave (200 fibras/tratamento).

Tabela 1. Composição percentual e calculada das dietas experimentais dos frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias)

Ingredientes (%)	Arg digestível %				
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790
Milho	54,00	54,00	54,00	54,00	54,00
Óleo Soja	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Soja-Farelo 45%	37,94	37,94	37,94	37,94	37,94
Sal comum	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284
Bicarbonato de Sódio	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241
Calcário Calcítico 38%	0,796	0,796	0,796	0,796	0,796
Fosfato bicálcico 18%	1,923	1,923	1,923	1,923	1,923
DL-Metionina 98%	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296
L-Lys 78%	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246
L-Treonina 98%	0,117	0,117	0,117	0,117	0,117
L-Arg 99%	0	0,101	0,202	0,303	0,404
Inerte (caulim)	0,500	0,399	0,298	0,197	0,096
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Premix min. e vit. <sup>1,2</sup>	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Valores calculados					
Proteína bruta %	22,4	22,4	22,4	22,4	22,4
EMA kcal/kg	3047	3047	3047	3047	3047
Cálcio %	0,920	0,920	0,920	0,920	0,920
Fósforo disponível %	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471
EMA kcal/kg	3047	3047	3047	3047	3047
Met. + cistina digestível %	0,890	0,890	0,890	0,890	0,890
Lys total %	1,383	1,383	1,383	1,383	1,383
Lys digestível %	1,260	1,260	1,260	1,260	1,260
Triptofano digestível %	0,252	0,252	0,252	0,252	0,252
Treonina digestível %	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
Arg total %	1,479	1,579	1,679	1,779	1,879
Arg digestível %	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790
Sódio %	0,220	0,220	0,220	0,220	0,220
Cloreto %	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200

<sup>1</sup>Mistura Vitaminica Inicial (Conteúdo por kg de premix): Vit. A 7.000.000,00 UI; Vit. D3 2.200.000,00 UI; Vit.E 11.000,00 mg; Vit. K3 1.600,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 5.000,00 mg, Vit. B12 12.000,00 mg; Niacina 35.000,00 mg; Ácido Pantotênico 13.000,00 mg; Ácido Fólico 800,00 mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

<sup>2</sup>Mistura mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00 mg; Cobre 16.000,00 mg; Iodo 2.400,00 mg; Zinco 100.000,00 mg; Manganês 140.000,00 mg; Selênio 400,00 mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

Para avaliar a quantidade de DNA, nas amostras de músculo peitoral, realizou-se a extração do DNA de fragmentos das mesmas duas amostras do músculo *Pectoralis major* direito por unidade experimental (12 amostras/tratamento) utilizadas na avaliação histomorfométrica das fibras musculares.

O DNA foi extraído de 50 mg de tecido muscular, utilizando o kit Dneasy Tissue® da QIAGEN, para isolamento de DNA genômico. Depois de processado, foi analisado por espectrofotometria para avaliação do rendimento da extração, em A260 e A280. Os valores foram plotados por mg de tecido.

Para a determinação das proteínas solúveis, as amostras foram descongeladas, trituradas e dissolvidas em solução tampão de lise. A solução (1%, g/v) foi centrifugada

por 15 minutos a 13.000 g. As proteínas solúveis foram determinadas colorimetricamente pela análise do sobrenadante, usando o método de Bradford (Bradford, 1976). A albumina sérica bovina foi usada como proteína-padrão.

Para determinação do rendimento de carcaça, foram pegas aleatoriamente duas aves por unidade experimental (12 aves/tratamento), identificadas e submetidas ao jejum alimentar por seis horas e abatidas por atordoamento com eletricidade e posterior sangria.

Para o cálculo de rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, em relação ao peso vivo que foi obtido individualmente antes do abate das aves. Para o rendimento dos cortes nobres, foi considerado o rendimento do peito inteiro com pele e ossos e das pernas (coxa e sobrecoxa com ossos e pele) que foi calculado em relação ao peso da carcaça eviscerada.

A gordura abdominal presente ao redor da cloaca, da bolsa cloacal, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada conforme descrito por Smith (1993). Em seguida, foi pesada e também calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

Os dados foram submetidos à análise de regressão pela decomposição polinomial dos graus de liberdade, referentes aos níveis de Arg e/ou pelo modelo descontínuo *Linear Response Plateau* (LRP), conforme o melhor ajuste obtido para cada variável. Para a análise dos dados foi utilizado o Software SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 1997).

Os dados foram analisados, segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1A_i + b_2A_i + b_3A_i + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$ : observação da variável dependente na unidade experimental j submetida ao nível i de Arg, i: 1,2,3,4,5 (1=; 1,390%; 2= 1,490%; 3= 1,590%; 4= 1,690% e 5= 1,790%);

$b_0$ : constante;

$b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$ : são, respectivamente, coeficientes linear, quadrático e cúbico de regressão da variável dependente em função dos níveis de Arg;

$e_{ij}$ : erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ij}$

Os coeficientes de determinação foram calculados como percentagem da soma de quadrados do modelo em relação à soma de quadrados total.

## Resultados e Discussão

A análise do perfil de aminoácidos das rações experimentais apontou valor de Lys total e de Arg total cerca de 10% acima do valor calculado.

Os resultados referentes ao crescimento muscular do peito (peso do peito, do filé e as medidas de espessura, comprimento e largura do filé), diâmetro e relação proteína:DNA das fibras musculares esqueléticas dos frangos de corte aos 7, 14, 21 e 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg suplementar estão representados na Tabela 2.

O peso do peito, do filé e a espessura do filé, aos 7 dias, aumentaram linearmente ( $p < 0,05$ ) em resposta aos níveis de Arg na dieta (Figura 1). O comprimento e a largura do filé do peito das aves não foram afetados ( $p > 0,05$ ) pelos níveis de Arg em nenhuma idade estudada.

Não foi observado efeito ( $p > 0,05$ ), aos 14 dias, no peso do peito e nem nas medidas do filé. Já o peso do filé foi influenciado de forma quadrática ( $p < 0,05$ ), sendo que o nível de 1,560% de Arg resultou no maior valor para o parâmetro (Figura 2).

O comportamento observado, aos 21 dias, para o peso do peito foi cúbico ( $p < 0,05$ ). Apesar deste comportamento, é possível observar uma trajetória linear no intervalo entre os níveis de 1,490% e 1,690%, indicando que a suplementação de Arg nestes níveis resultou no aumento do peso do peito (Figura 3). Para o peso e espessura do filé, a exigência foi maior, estas variáveis apresentaram comportamento linear crescente ( $p < 0,05$ ) em resposta à suplementação de Arg (Figura 3).

Aos 42 dias, nenhuma medida do desenvolvimento do peito foi afetada ( $p > 0,05$ ) pelos níveis de Arg. É importante considerar, que a suplementação de Arg foi apenas durante a fase inicial (1 a 21 dias), na fase de crescimento, o nível de Arg da ração que todas as aves passaram a receber continha 1,290% de Arg digestível, nível bem abaixo dos utilizados na primeira fase. Isto pode ter influenciado o processo de hipertrofia que vinha ocorrendo, a julgar pelo peso do filé e o aumento do diâmetro da fibra muscular aos 21 dias. Este resultado indica que a suplementação de Arg, acima dos níveis, atualmente, recomendados para a fase de crescimento pode ser necessária no desenvolvimento muscular dos frangos de corte.

Tabela 2. Médias e estimativas dos parâmetros de crescimento muscular do peito, diâmetro e relação proteína:DNA das fibras musculares esqueléticas de frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

	Arg digestível %					CV (%)	efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
	7 dias						
Peso do peito, g	18,00	18,68	19,36	20,04	20,73	13,78	linear
Peso do filé, g	3,59	3,75	3,91	4,07	4,23	14,54	linear
Espessura do filé, mm	5,15	5,29	5,43	5,57	5,71	9,81	linear
Comprimento do filé, cm	6,14	6,28	6,19	6,14	6,02	6,25	NS
Largura do filé, cm	1,88	1,97	1,98	1,95	2,10	8,50	NS
Diâmetro da fibra muscular, $\mu$ m	12,71	12,01	13,20	13,04	13,42	9,28	NS
Relação proteína:DNA	12,09	11,99	12,67	12,36	12,00	24,72	NS
	14 dias						
Peso do peito, g	66,87	71,18	64,82	66,45	62,05	8,06	NS
Peso do filé, g	13,47	14,18	14,29	13,82	12,77	9,63	quadrático
Espessura do filé, mm	7,70	8,01	7,48	8,04	7,15	8,13	NS
Comprimento do filé, cm	8,99	8,99	8,84	9,05	8,89	3,60	NS
Largura do filé, cm	2,91	3,13	3,00	3,04	3,04	5,43	NS
Diâmetro da fibra muscular, $\mu$ m	17,43	16,93	17,15	18,10	19,77	5,12	quadrático
Relação proteína:DNA	25,99	23,35	25,20	26,13	25,20	27,06	NS
	21 dias						
Peso do peito, g	153,04	151,54	161,71	168,49	156,85	7,79	cúbico
Peso do filé, g	32,20	33,20	34,21	35,22	36,22	12,91	linear
Espessura do filé, mm	10,81	11,14	11,48	11,81	12,14	11,24	linear
Comprimento do filé, cm	11,78	11,86	11,79	12,30	11,65	3,93	NS
Largura do filé, cm	4,11	4,23	4,20	4,33	4,20	5,60	NS
Diâmetro da fibra muscular, $\mu$ m	30,65	32,24	33,12	33,28	32,72	7,00	quadrático
Relação proteína:DNA	32,08	34,84	31,40	34,90	35,43	22,13	NS
	42 dias						
Peso do peito, g	608,39	575,58	606,83	616,08	595,48	6,41	NS
Peso do filé, g	141,09	134,57	142,79	143,35	139,51	7,84	NS
Espessura do filé, mm	20,57	21,73	22,34	22,39	21,89	7,46	NS
Comprimento do filé, cm	17,83	17,48	17,53	17,84	17,54	3,30	NS
Largura do filé, cm	6,62	6,53	6,57	6,51	6,50	3,59	NS
Diâmetro da fibra muscular, $\mu$ m	44,89	44,93	43,56	46,13	44,29	5,55	NS
Relação proteína:DNA	41,58	43,05	41,89	40,62	37,96	17,41	NS

CV: coeficiente de variação; NS= (p>0,05)

A relação Arg:Lys, utilizando os níveis de Arg que proporcionaram os melhores resultados na avaliação do desenvolvimento do peito na fase inicial, é em torno de 130, taxa bem mais elevada que a recomendada pelos manuais (NRC, 1994; Rostagno *et al.*, 2000) de 105 e 102%, respectivamente.

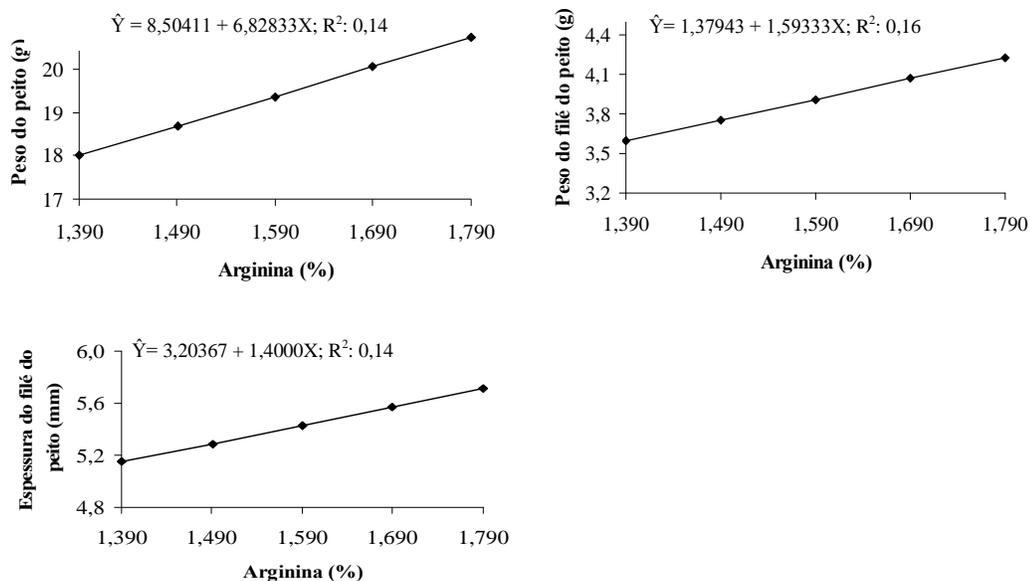


Figura 1. Peso do peito, de peso do filé e da espessura do filé do peito de frangos de corte aos 7 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

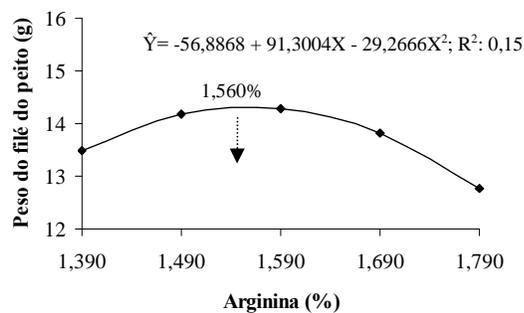


Figura 2. Peso do filé do peito de frangos de corte aos 14 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

O diâmetro da fibra muscular apresentou variação somente aos 14 e 21 dias. Nestas idades, o efeito foi quadrático ( $p < 0,05$ ), indicando valores máximos obtidos pelos níveis de 1,510 e 1,662% de Arg, respectivamente (Figura 4).

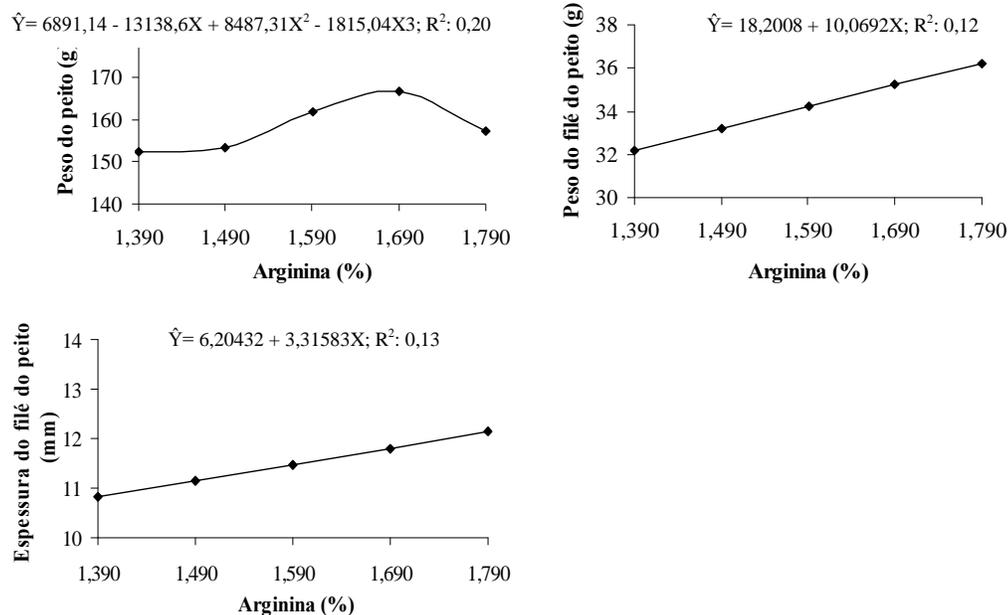


Figura 3. Peso do peito, de peso do filé e da espessura do filé do peito de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

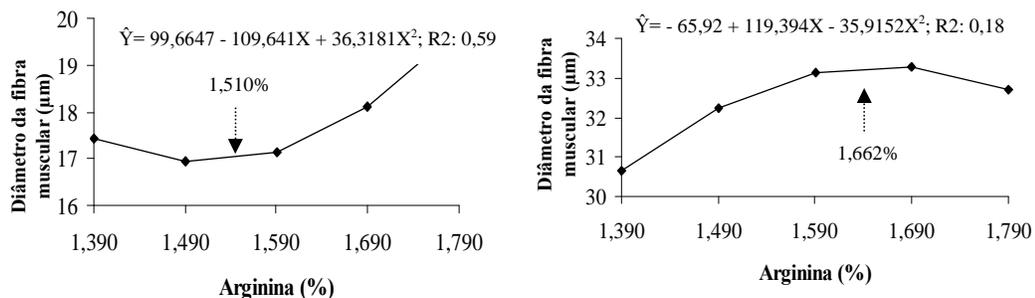


Figura 4. Diâmetro da fibra muscular do peito de frangos de corte aos 14 e 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de Arg na dieta inicial

O processo de hipertrofia das fibras musculares pós-eclosão ocorre, primeiramente, no sentido longitudinal da fibra pelo aumento do número de sarcômeros e, posteriormente, ocorre aumento do diâmetro pela deposição de proteínas miofibrilares. Assim, a contribuição do comprimento da fibra, aos 7 dias pode ter sido maior que do diâmetro, já que a soma dos dois fatores resulta no maior peso do peito e do filé, como observado neste experimento.

A avaliação do diâmetro da fibra não só é um indicador do processo de hipertrofia muscular, mas também da qualidade da carne. O diâmetro da fibra está associado com a firmeza e resistência da carne. Nas linhagens de alto rendimento muscular são observadas alterações metabólicas no 'post mortem' principalmente na

musculatura do peito, que indicam maior susceptibilidade à PSE (carne pálida, mole e exudativa). Possivelmente, o maior diâmetro das fibras musculares limita o suprimento de energia e oxigênio por causa da redução da vascularização. Também é provável uma maior dificuldade na eliminação de resíduos do metabolismo como CO<sub>2</sub> e lactato durante o período ‘ante mortem’.

Assim, a melhora na deposição muscular nestas linhagens deve ser monitorada a fim de avaliar a qualidade da carne, visto que os atributos, aparência e consistência, determinam a aceitação do produto pelo consumidor, além de interferirem na elaboração de produtos processados pela indústria.

O número de fibras musculares também pode estar associado aos programas de seleção das linhagens comerciais de corte. Scheurmann *et al.* (2004) comprovaram que as linhagens de corte têm duas vezes mais fibras neste músculo que as de postura. A contagem de fibras musculares do peito é dificultada pela orientação das fibras musculares, entretanto, podem auxiliar no entendimento das exigências de aminoácidos na deposição de proteína muscular.

Não foi observado efeito ( $p > 0,05$ ) da suplementação de Arg para a relação proteína:DNA em nenhuma idade avaliada. Mas, o aumento da relação proteína:DNA, em função da idade observado durante o período experimental, está de acordo com a literatura consultada (Uni *et al.*, 1998) e é atribuída a maior atividade mitogênica e protéica das células em animais jovens (Tabela 02).

As células satélite são essencialmente ativas nos primeiros dias pós-eclosão, mas a sua atividade mitótica aos 7 dias de idade é reduzida em torno de três vezes quando comparada ao primeiro dia de vida (Moore *et al.*, 2005). Uma vez que o aumento da razão proteína:DNA reflete o aumento da massa tecidual sem aumento do número de células, a falta de resposta da relação DNA/proteína à Arg, principalmente aos 7 dias, demonstra que a Arg não interferiu na atividade mitótica das células satélite, via ação estimulatória sobre a secreção de IGF-I, como proposto nos estudos realizados com mamíferos.

Por outro lado, uma hipótese é que a suplementação de Arg poderia ser efetiva para esse mecanismo se fosse realizada, ainda, no período embrionário pela aplicação ‘in ovo’. Kikuchi *et al.* (1991) demonstraram que o IGF-I é detectado no plasma de embriões já no 9º dia de incubação, alcançando picos entre o 15º e 17º dia, período em que ocorre a formação das fibras musculares secundárias (Kocamis & Killefen, 2003). O tratamento ‘in vitro’ de embriões também aumentou o peso corporal dos pintinhos ao

nascimento (Girbau *et al.*, 1988). A liberação de IGF é importante na regulação da hiperplasia muscular por estimular a proliferação e diferenciação mioblástica, resultando em animais com maior número de fibras.

Considerando que vacinas já vêm sendo aplicadas ‘in ovo’, aos 17 a 18 dias de incubação (Uni & Ferket, 2004), a injeção de nutrientes não envolve nenhum procedimento adicional na rotina dos incubatórios. A possibilidade de suplementação de Arg, na fase embrionária, poderia aumentar a proliferação das células precursoras e a geração de um número maior de fibras musculares, via IGF na fase pós-natal.

Todavia, não pode ser descartada a ação do IGF-I pela suplementação de Arg, visto que apesar de não demonstrado aumento da relação proteína:DNA com a suplementação de Arg, houve efeito no peso do peito e filé e no diâmetro das fibras musculares. Uma vez que o crescimento muscular pós-eclosão é dependente tanto do aumento da relação proteína:DNA como do aumento no tamanho da miofibrila (Halevy *et al.*, 2003), pode ser afirmado que o crescimento muscular foi estimulado pela Arg.

O GH age como hormônio anabólico, via IGF, aumentando a captação de aminoácidos e síntese de proteína. O IGF-I por ser um potente mitogênico, pode estimular e ou coordenar os processos metabólicos necessários tanto para recrutar as células satélite quanto para aumentar a proteína muscular.

Por outro lado, o efeito da Arg pode ter sido ‘per si’, independente da elevação plasmática de GH ou IGF-I como também observado por Kim *et al.* (2004), que obtiveram melhora no ganho de peso de leitões sem alteração na concentração plasmática de hormônios anabólicos. A suplementação de Arg contribuiu com o processo de hipertrofia, provavelmente, por melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes (Capítulo VI), o que resultou no aumento da massa muscular observada na fase inicial. Este processo está relacionado à eficiência do ‘turnover’ protéico ou ao resultado líquido entre a síntese e a degradação protéica, como definiram Tessard *et al.* (2000).

Sklan & Noy (2004) observaram que tanto a alteração na relação quanto no conteúdo de aminoácidos, na dieta, altera mais o catabolismo dos aminoácidos que o anabolismo e, neste sentido, os níveis dietéticos de aminoácidos não essenciais devem ser considerados. Moran & Stilborn (1996) demonstraram que a suplementação com ácido glutâmico aumenta a síntese e diminuiu a degradação protéica do músculo esquelético dos frangos de corte. Entretanto, não existem estudos desta natureza com a Arg.

Nas linhagens de alto desempenho, o crescimento e o desenvolvimento muscular podem estar associados à redução do catabolismo protéico. Dransfield & Sosnicki (1999) demonstraram que, nestas linhagens, as enzimas inibitórias da proteólise muscular são mais ativas que nas linhagens de crescimento mais lento. Isto também pode explicar a diversidade de respostas pela suplementação de aminoácidos associadas aos experimentos em que são utilizadas diferentes linhagens.

Os resultados referentes à avaliação da carcaça dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis de Arg suplementar são apresentados na Tabela 3. Não houve efeito ( $p>0,05$ ) da suplementação de Arg em nenhum parâmetro avaliado.

Tabela 3. Médias das características de rendimento de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com diferentes níveis dietéticos de Arg no período de 1 a 21 dias de idade.

	Arg digestível %					CV (%)	Efeito
	1,390	1,490	1,590	1,690	1,790		
Peso vivo, g	2833,33	2807,08	2683,75	2795,00	2688,33	4,87	NS
Peso da carcaça, g	1875,33	1868,00	1793,83	1863,83	1785,00	5,61	NS
Rendimento da carcaça, %	66,12	66,56	66,81	66,69	66,36	2,01	NS
Rendimento do peito, %	35,80	36,82	36,12	36,22	37,09	2,82	NS
Rendimento das coxas e sobrecoxas, %	32,26	31,52	32,33	32,17	31,73	2,94	NS
Rendimento da gordura abdominal, %	1,88	2,22	1,66	2,04	1,90	20,51	NS

CV: coeficiente de variação; NS= ( $p>0,05$ )

Os resultados do rendimento da carcaça são subseqüentes à suplementação na fase inicial (1 a 21 dias), por isso, a falta de resposta aos níveis dietéticos de Arg pode ser atribuída à drástica redução do nível utilizado de Arg, na fase de crescimento, em relação aos níveis da primeira fase, uma vez que houve efeito positivo no peso do peito e filé na fase inicial.

A resposta em termos de rendimento de carcaça e partes é bastante ambígua na literatura consultada. Mendes *et al.* (1997) verificaram que o aumento da relação Arg:Lys melhorou o rendimento de carcaça e reduziu a gordura abdominal em frangos de corte.

Já, Costa *et al.* (2001), utilizando seis níveis adicionais de Arg digestível (de 1,00 a 1,400%) e um valor fixo de Lys (1,160%), relataram que o rendimento de carcaça, peito com pele e osso e filé de peito não foi influenciado pelo aumento da suplementação de Arg. Por outro lado, o rendimento de perna (coxa + sobrecoxa) e da gordura abdominal melhorou linearmente com o aumento da Arg.

Atencio *et al.* (2004) não encontraram diferença no peso dos cortes com a adição crescente de Arg digestível nas fases de 24 a 38 dias (1,08 a 1,29%) e 44 a 56 dias (0,96 e 1,23). Os autores concluíram que o resultado se deve ao fato dos níveis de Arg estarem dentro das exigências.

A adição de níveis elevados de Arg, na primeira fase, também não alterou a deposição de gordura abdominal, discordando de Costa *et al.* (2001) e Mendes *et al.* (1997), porém estes autores suplementaram também as rações de crescimento. A ausência do efeito sobre a gordura abdominal também demonstrou que a suplementação de Arg, em níveis de até 30% acima do recomendado, não afetou o equilíbrio entre os aminoácidos essenciais e não essenciais nas rações experimentais. O conteúdo lipídico da ave é significativamente influenciado por desvios nutricionais, particularmente em relação à composição em aminoácidos.

### **Conclusão**

A suplementação de Arg acima das exigências, nas dietas iniciais de frangos de corte, não interferiu na atividade mitótica das células satélite, via ação estimulatória sobre a secreção de IGF-I. Todavia, não pode ser descartada a hipótese da ação do IGF-I pela suplementação de Arg, visto que houve efeito no peso do peito e do filé e no diâmetro das fibras musculares esqueléticas, indicando que a hipertrofia muscular foi estimulada pela Arg.

O rendimento da carcaça não foi afetado pelos níveis dietéticos de Arg na ração inicial dos frangos de corte.

A suplementação de Arg acima dos níveis, atualmente, recomendados para a fase de crescimento pode ser necessária no desenvolvimento muscular dos frangos de corte.

### **Referências**

Acar N, Moran Jr ET, Bilgili ES. Live performance and carcass yield of male broilers from two commercial strain crosses receiving rations containing lysine below and above the established requirement between six and eight weeks of age. *Poultry Science* 1991; 70(2):315-21.

Atencio A, Albino LFT, Rostagno HS, Oliveira DC, Vieites FM, Pupa JMR. Exigência de arginina digestível para frangos de corte machos em diferentes fases. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2004; 33(6):1456-66.

Ball RO., Urschel, KL, Pencharz, PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *Journal of Nutrition* 2007; 137(6):1626–1641.

Bischoff R. Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *Anatomical Record* 1975; 182:215-36.

Bolea S, Pertusa JAG, Martín F, Sanchez-Andrés JV, Soria B. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *European Journal of Physiology* 1997; 433:699-704.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72(3):248-54.

Costa FGP, Rostagno HS, Toledo, RS, Albino LFT. Efeito da relação arginina:lisina sobre o desempenho e qualidade de carcaça de frangos de corte de 3 a 6 semanas de idade, em condições de alta temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001b; 30(6):2021-25.

Dransfield E, Sosnicki AA. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Science* 1999; 78(5):743-46.

Dubowitz V, Brooke M. *Muscle biopsy: a modern approach*. London: W.B. Saunders Company; 1984. p. 472.

Dubowitz V, Brooke M. *Muscle biopsy: a modern approach* London: W.B. Saunders Company; 1984.

Duclos MJ, Wilkie RS, Goddard C. Stimulation of DNA synthesis in chicken muscle satellite cells by insulin and insulin-like growth factors: evidence for exclusive mediation by a type-I insulin-like growth factor receptor. *Journal Endocrinology* 1991; 128:35-42.

Duclos MJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA levels and chicken muscle growth. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 56(3):25-35.

Edmonds MS, Baker DH. Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick. *Journal of Animal Science* 1987; 65(3):699–705.

Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrinology Review* 1996; 17:481-517.

Girbau M, Gomez JA, Lesniak MA, De Pablo F. Insulin and insulin-like growth factor I both stimulate metabolism, growth, and differentiation in the postneurula chick embryo. *Endocrinology* 1987; 121:1477-82.

Halevy O, Nadel Y, Barak M, Rozenboim I, Sklan D. Early posthatch feeding stimulates satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in turkey poults. *Journal of Nutrition* 2003; 133(5):1376–82.

Hawke JT, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal Applied Physiology* 2001; 91(3):534–51.

Khan MA. The histoenzymology of striated muscle fibers on overview. *Cellular Molecular Biology* 1977; 22:383-93.

Kikuchi K, Buonomo FC, Kajimoto Y, Rotwein P. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development. *Endocrinology* 1991; 128(3):1323-28.

Kim SW, Mcpherson RL, Wu G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young piglets. *Journal of Nutrition* 2004; 134(3):625-30.

Kocamis H, Killefer J. Expression profiles of IGF-1, IGF-II, bFGF and TGFB2 growth factors during chicken embryonic development. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*; 27:367-72.

Mendes AA, Watkins SE, England JA. Influence of dietary lysine levels and arginine:lysine ratios on performance of broilers exposed to heat or cold stress during the period of three to six weeks of age. *Poultry Science* 1997; 76(3):472-81.

Merimee JT, Rabinowitz D, Fineberg SE. Arginine-initiated release of human growth hormone. Factors modifying the response in normal man. *New England Journal Medicine* 1969; 280:1434-438.

Moore T, Ferket, PR, Mozdziak PE. Muscle development in the late embryonic and early post-hatch poult. *International Journal of Poultry Science* 2005; 4(3):138-142.

Moran Jr ET, Stilborn B. Effect of glutamic acid on broiler given sub marginal crude protein with adequate essential amino acids using feeds high and low in potassium. *Poultry Science* 1996; 75(2):120-129, 1996.

Moss FP. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. *American Journal of Anatomy* 1968; 122:555-63.

NRC. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry*. 8<sup>th</sup> rev. ed. Washington: National Academy Press; 1994.

Roith DL, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin Hypothesis:2001. *Endocrine Reviews* 2001; 22(1):53-74.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira RF, Lopes DC. *Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2000. 141p.

Scheuermann GN, Bilgili SF, Tuzun S, Mulvaney EDR. Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poultry Science* 2004; 83(8):1404–12.

Sklan D, Noy Y. Catabolism and deposition of amino acids in growing chicks: effect of dietary supply. *Poultry Science* 2004; 83(6):952-61.

Smith JH. Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken. *Poultry Science* 1963; 42(4):283-90.

Smith MO. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. *Poultry Science* 1993; 72(7):1146-50.

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

Uni Z, Ferket RP. Methods for early nutrition and their potential. *World's Poultry Science Journal* 2004; 60(1):101-111.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG; sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário. Versão 7.1. Viçosa, 1997. 150p.

## VII – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de níveis elevados de Lys afetou adversamente o metabolismo da Arg, aumentando sua exigência. Houve pior desempenho produtivo ao final da fase inicial como resultado do antagonismo entre estes aminoácidos. Provavelmente, o efeito negativo do antagonismo entre Lys e Arg, no ganho de peso, não se deveu apenas à redução do consumo alimentar, como observado quando há um desequilíbrio entre aminoácidos, mas por outros efeitos sobre o metabolismo e a utilização da Arg, o que implica em uma exigência metabólica, mas não necessariamente dietética de Arg.

A ação dos níveis de Lys e Arg, sobre o tecido ósseo, foi marcante, apesar de multifacetada, o que requer estudos complementares a fim de esclarecer o mecanismo envolvido. É necessário melhor entendimento da participação destes aminoácidos no crescimento ósseo, em nível celular e molecular para que estas informações possam ser empregadas em estratégias nutricionais para o melhor desenvolvimento e maturidade óssea.

Apenas a suplementação de Lys elevou os níveis plasmáticos de IGF-I. A razão da Arg não ter influenciado a secreção deste fator do crescimento, pode ser atribuída à inexistência de um ciclo da uréia funcional em espécies uricotélicas, e, por isso, a Arg não é sintetizada 'de novo'. Neste sentido, os níveis plasmáticos de Arg estão na dependência dos níveis dietéticos, da regulação da síntese de proteínas e principalmente do nível de Lys da dieta.

Do mesmo modo, a suplementação de Arg acima das exigências, nas dietas iniciais de frangos de corte, não interferiu na atividade mitótica das células satélite, via ação estimulatória sobre a secreção de IGF-I. Por outro lado, houve efeito positivo da Arg no desenvolvimento do peito dos frangos de corte, demonstrando que os níveis de

Arg, atualmente, recomendados para o máximo ganho de peso podem ser menores do que os exigidos para o desenvolvimento muscular.

A suplementação de Arg, acima das exigências, nas rações iniciais dos frangos de corte, melhorou o desempenho produtivo, o desenvolvimento dos órgãos linfóides e o crescimento da mucosa intestinal, provavelmente, pelo aumento dos níveis de ornitina disponível para a síntese de poliaminas. Como as aves não podem sintetizar ornitina, praticamente, toda a ornitina plasmática é derivada do metabolismo da Arg e, por isso, as concentrações teciduais de poliaminas nas aves são particularmente responsivas à manipulação dietética da Arg. Neste sentido, é possível atribuir à arginase renal o controle da síntese de poliaminas via degradação da Arg.

Entretanto, a degradação excessivamente rápida de Arg, pela elevada concentração plasmática de Lys, em ornitina e uréia pela arginase, pode comprometer a síntese de NO, sendo esta a única via fisiológica de produção deste composto. Portanto, futuros estudos a respeito do metabolismo da Arg, em espécies uricotélicas, devem visar o melhor entendimento da relação entre as enzimas-chave, arginase e a óxido nítrico sintetase, as quais competem entre si pelo substrato comum, o que pode levar à redução na síntese de NO pelos leucócitos. Isto é particularmente importante no que diz respeito às situações em que ocorre uma ativação do sistema imune, as quais exigem elevadas concentrações de NO.

Futuramente, pelo crescente aumento da disponibilidade comercial para a suplementação de dietas, os aminoácidos sintéticos deverão se constituir em efetivos nutracêuticos na prevenção de doenças e manutenção da sanidade das aves.