

## **Efeito da suplementação com L-arginina no início de gestação (dia 2 ao 37) na concentração de óxido nítrico e na capacidade antioxidante de fêmeas suínas**

LÍVIA M. R. BARBOSA<sup>1</sup>, KARINE A. COSTA<sup>1</sup>, GUSTAVO A. RODRIGUES<sup>1</sup>, DANIEL S. S. BASTOS<sup>2</sup>, FELIPE C. SANTOS<sup>2</sup>, DANTE T.V. JÚNIOR<sup>1</sup>, MAYKELLY S. GOMES<sup>1</sup>, MARCOS H. SOARES<sup>1</sup>, ALYSSON SARAIVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil  
Contato: livia.barbosa@ufv.br

**Resumo:** Ainda permanecem em grande parte elusivos os mecanismos subjacentes pelos quais a arginina (ARG) pode influenciar no aumento da capacidade antioxidante e/ou a redução do estresse oxidativo e na modulação do ambiente intrauterino da fêmea suína gestante. Dessa forma, objetivou-se com este estudo, avaliar os efeitos da suplementação com 1,0 % de L - ARG na ração de fêmeas suínas durante o início da gestação, na produção de óxido nítrico (ON) e nos marcadores de estresse oxidativo no plasma e placenta. Entre os dias 2 e 37 de gestação, 14 fêmeas suínas gestantes, foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em dois tratamentos, ração basal ou ração basal com 1,0 % de L - ARG, com 8 e 6 repetições respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e os resultados foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$ . A suplementação com 1,0 % de L - ARG aumentou ( $P = 0,039$ ) a concentração plasmática de ON, enquanto não alterou ( $P > 0,05$ ) a concentração de ON na placenta, a atividade das enzimas catalase e glutathione s-transferase e a concentração de malonaldeído no plasma e na placenta das porcas. Estes resultados sugerem que a ARG pode atuar na modulação do ambiente intrauterino e da capacidade antioxidante endógena em fêmeas suínas no início da gestação.

**Palavras Chave:** Porca; catalase; glutathione s-transferase; malonaldeído.

### **Effects of arginine supplementation during early gestation (day 2 to 37) on nitric oxide concentration and antioxidant capacity of sows**

**Abstract:** The underlying mechanisms on which arginine (ARG) can influence the increase of the antioxidant capacity and/or the reduction of the oxidative stress and intrauterine environment modulation in sows still remain largely unclear. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of dietary supplementation with 1.0% L-ARG during early gestation of sows on nitric oxide (NO) and oxidative stress markers in the plasma and placental tissue. Between d 2 and 37 of gestation, 14 pregnant sows were randomly assigned to two dietary treatments. Treatments consisted of a basal diet or basal diet with 1.0% L-ARG, with 8 and 6 replicates, respectively. Differences among treatment means were evaluated by analysis of variance. Differences were declared significant when  $P < 0.05$ . Dietary supplementation with 1.0% L-ARG increased ( $P = 0,039$ ) plasma NO concentration, whereas it did not change ( $P > 0.05$ ) the concentration of NO in the placenta, the activity of catalase and glutathione s-transferase enzymes and malonaldehyde concentration in the sows plasma and placenta. These results suggest that ARG can play a role in the modulation of the intrauterine environment and the endogenous antioxidant capacity during early gestation in sows.

**Keywords:** Sows; catalase; glutathione s-transferase; malonaldehyde.

**Introdução:** O uso de aminoácidos como nutriente funcional durante a gestação vem sendo estudado devido a participação destes em vias metabólicas relacionadas a funções reprodutivas dos animais (Palencia et al., 2018). Dentre estes, a arginina (ARG) se destaca por ser precursor biológico de moléculas ativas como o óxido nítrico (ON), que favorece a angiogênese e a vasodilatação, resultando em aumento do fluxo sanguíneo (Krogh et al., 2017). A disponibilidade de ARG também pode ser considerada como fator crítico na mitigação do estresse oxidativo (EO) e na indução de resposta antioxidante endógena (Liang et al., 2018). Contudo, não há consenso sobre a melhor forma de utilização desse aminoácido durante a gestação de fêmeas suínas, sendo os resultados de estudos conflitantes (Li et al., 2015). Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da suplementação da ração com 1,0 % de L-ARG, durante o início da gestação, na concentração de ON e nos marcadores de EO no plasma e na placenta de fêmeas suínas.

**Material e Métodos:** Foram utilizadas 14 fêmeas suínas multíparas. Foram realizadas duas inseminações, a primeira (dia 0), 12 h após o momento da constatação do reflexo de tolerância ao homem com auxílio do macho e a segunda, 12 h após a primeira. O início do fornecimento das rações experimentais ocorreu 24h após a última inseminação. As fêmeas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em 2 tratamentos: ração basal (Rostagno et al., 2017) ou ração basal com 1,0 % de L - ARG, com 8 e 6 repetições, respectivamente. A fêmea foi considerada a unidade experimental. Foram fornecidos 1,8 kg de ração/dia entre os dias 2 e 4 de gestação e 2,2 kg de ração/dia entre os dias 5 e 37. Antes do abate, foram coletadas amostras de sangue do seio orbital das fêmeas em tubos com EDTA. O sangue foi centrifugado a 3500 x g a 4°C. No 37º dia de gestação, imediatamente após o abate, foram coletadas 3 placentas de cada extremidade do corno uterino esquerdo. As placentas coletadas foram imersas em nitrogênio líquido. As placentas e o plasma foram armazenados em freezer a -20°C. No plasma e na placenta foram determinadas as concentrações dos metabólitos do ON (nitrito e nitrato) (Tsikas, 2007), a atividade das enzimas catalase (Aebi, 1984) e glutathione-S-transferase (Habig et al., 1974), a concentração de malonaldeído (Buege e Aust, 1978) e de proteína total (Bradford 1976). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento MIXED do SAS, versão 9.0 (Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, USA). Os resultados foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$ .

**Resultado e Discussão:** A alta demanda metabólica durante a gestação de fêmeas suínas, pode estar relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pela placenta (Berchieri-Ronchi et al., 2011) e a ARG está relacionada a redução do EO pelo aumento da resposta antioxidante endógena (Liang et al., 2018). Entretanto, tanto no plasma (tabela 1) como na placenta (tabela 2) a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione S-transferase não foi alterada ( $P > 0,05$ ) pela adição 1,0 % de L-ARG na ração. A concentração de malonaldeído, indicador da peroxidação lipídica, no plasma e na placenta das matrizes também não foi alterada ( $P > 0,05$ ). A suplementação com L-ARG também está relacionada ao aumento da produção de ON que, além de influenciar na angiogênese e na vasodilatação, pode atuar na mitigação do EO. Em condições fisiológicas, o ON produzido pela placenta é excretado na circulação materna (Schoots et al., 2018). De fato, no presente estudo, as concentrações de ON, quantificadas através de seus metabólitos estáveis (nitrito e nitrato) não foram diferentes ( $P=0,926$ ) na placenta das fêmeas suplementadas ou não com L-ARG. Entretanto, no plasma, a suplementação com L-ARG proporcionou aumento ( $P=0,039$ ) de aproximadamente 67% na concentração de ON. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Li et al. (2015) em estudo com a suplementação de 1,3% de L-ARG HCl para fêmeas suínas em início de gestação e evidenciam o potencial efeito da ARG na modulação do ambiente intrauterino.

Tabela 1 – Efeitos da suplementação com 1,0 % de l-arginina na atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione s-transferase (GST) e na concentração dos metabólitos do óxido nítrico (nitrito,  $\text{NO}_2$  e nitrato,  $\text{NO}_3$ ) e malonaldeído (MDA) na placenta de fêmeas suínas.

Item	Controle	Arginina	p-valor
CAT, ku/min.mL	1,508	1,807	0,208
GST, u/mL	22,737	18,446	0,156
$\text{NO}_2/\text{NO}_3$ , $\mu\text{M}$	1,011	0,992	0,926
MDA, nmol/mg proteína	7,168	6,222	0,185

Tabela 2 – Efeitos da suplementação com 1,0 % de l-arginina na atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione s-transferase (GST) e na concentração dos metabólitos do óxido nítrico (nitrito,  $\text{NO}_2$  e nitrato,  $\text{NO}_3$ ) e malonaldeído (MDA) no plasma de fêmeas suínas.

Item	Controle	Arginina	p-valor
CAT, ku/min.mL	1,751	1,933	0,659
GST, u/mL	24,349	24,045	0,960
$\text{NO}_2/\text{NO}_3$ , $\mu\text{M}$	2,486	7,573	0,039
MDA, nmol/mg proteína	0,296	0,227	0,579

**Conclusão:** A suplementação com 1,0 % de L-arginina aumenta a concentração plasmática de óxido nítrico, enquanto não altera a concentração de óxido nítrico na placenta, a atividade das enzimas catalase e glutathione s-transferase e a concentração de malonaldeído no plasma e na placenta de fêmeas suínas no início de gestação.

**Agradecimentos:** Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro a este projeto.

**Referências Bibliográficas:** Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v. 105, p. 121-6, 1984. Berchieri-Ronchi C.B.; Kim, S.W.; Zhao, Y.; et al. Oxidative stress status of high prolific sows during pregnancy and lactation. *Animal*, v. 5, p. 1774-1779. 2011. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 7130-7139, 1974. Krogh, U.; Oksbjerg, N.; Storm, A. C.; et al. Mammary nutrient uptake in multiparous sows fed supplementary arginine during gestation and lactation. *J. Anim. Sci*, v.95, p. 2517-2532. 2017. Li, J.; Xia, H.; Yao, W.; et al. Effects of arginine supplementation during early gestation (day 1 to 30) on litter size and plasma metabolites in gilts and sows, *J. Anim. Sci*, v.93, p. 5291-5303. 2015. Liang, M.; Wang, Z.; Li, H.; et al. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. *Food Chem Toxicol*. 2018. Palencia, J.Y.P.; Lemes, M.A.G.; Garbossa, C.A.P.; et al. Arginine for gestating sows and foetal development: A systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr*, v. 13, p.102:204. 2018. Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ª edição. Univ. Fed. de Viçosa, Viçosa, Brasil. 488p. 2017. Schoots, M.H.; Gordijn, S.J.; Scherjon, S.A. et al. (In press). Oxidative stress in placental pathology. *Placenta*. 2018. Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B*, v. 851, p. 51-70. 2007.