

EFFETTO DELLA SUPPLEMENTAZIONE DI L-ARGININA SULLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE E SUL PROFILO MICROBICO FECALE DELLA SCROFA IN GESTAZIONE

CONTRIBUTE OF L-ARGININE SUPPLEMENTATION ON THE PRODUCTIVE PERFORMANCE AND MICROBIAL FECAL PROFILE OF GESTATING SOWS

CORREA F., BERTOCCHI M., BOSI P., LUISE D., SPINELLI E., TREVISI P.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) - Università di Bologna

Parole chiave: L-Arginina, Scrofa, Gestazione, Microbiota

Key words: L-Arginine, Sow, Gestation, Microbiome

RIASSUNTO

Studi recenti hanno mostrato come l'integrazione di L-Arginina (Arg), nella fase iniziale della gestazione in scrofe ad alta prolificità possa favorire la sopravvivenza embrionale, il numero di nati e il peso alla nascita dei suinetti. Inoltre, è stato osservato che l'Arg influenza il profilo microbico intestinale del suino, regolandone il metabolismo amminoacidico. L'obiettivo di questo studio è quello di verificare l'efficacia di un'integrazione di Arg sulle performance riproduttive ed il profilo microbico fecale della scrofa. Un totale di 205 scrofe è stato diviso in due gruppi sperimentali: i) controllo (CON) (102 scrofe); ii) gruppo trattato (ARG) (103 scrofe) la cui dieta è stata integrata con lo 0,25% in più di Arg per tutta la gestazione. I dati sulle performance della scrofa e della nidata sono stati raccolti dal parto allo svezzamento. Inoltre, tre giorni prima del parto sono stati raccolti tamponi rettali per l'analisi del microbiota fecale. L'Arg ha aumentato il numero di suinetti nati ($p = 0,043$), tendenzialmente aumentato il numero di nati vivi ($p = 0,086$), ridotto la percentuale di IUGR ($p = 0,090$) e di morti a d0-d3 ($p = 0,088$). L'Arg non ha modificato la struttura microbica fecale (indici Alfa e Beta) ma ha aumentato l'abbondanza relativa della famiglia delle Bacteroidaceae e del genere *Bacteroides* ($p = 0,0001$). I risultati confermano che l'Arg svolge un ruolo chiave nella nutrizione e nella fisiologia della scrofa in gestazione senza comprometterne l'eubiosi intestinale e suggeriscono un effetto positivo sulle performance produttive anche a una bassa dose di integrazione.

ABSTRACT

Recent studies have shown that the integration of the amino acid L-Arginine (Arg), in highly prolific sows, in the initial phase of gestation has favoured embryonic survival, the number of piglets born and the birth weight. In addition, Arg also influence the microbiome profile of pigs, by regulating amino acid metabolism. The objective of this study was to test the effect of Arg supplementation on the sow's reproductive performance and on the faecal microbial profile. 205 sows were divided into two experimental groups: a control group (CON) (102 sows) and a group supplemented with 0.25% of Arg (ARG) for the whole pregnancy period. Data on the sow and litter performance were collected at farrowing, while before farrowing, rectal swabs were collected for the analysis of the microbial profile. Arg improved the number of total born piglets ($p = 0.043$) and tended to improve the number of total born alive ($p = 0.086$) and to reduce IUGR % ($p = 0.090$) and dead piglets at d0-d3 ($p = 0.088$). Arg did not modify the fecal microbial structure (alpha and beta indices) but increased the relative abundance of Bacteroidaceae family and *Bacteroides* genera (p

= 0.0001). The results support the knowledge that Arg plays a key role in nutrition and physiology of pregnant sows without compromising gut eubiosis and suggest a positive effect on sow productive performance at a low supplementation dose.

INTRODUZIONE

Nel suino, le moderne linee genetiche sono caratterizzate da elevata prolificità, carattere che è spesso associato ad una maggiore disomogeneità di peso della nidiata, con una percentuale superiore di soggetti sottopeso (< 1 kg) (Yuan et al. 2015). Il basso peso corporeo è correlato positivamente al tasso di mortalità e morbilità nel periodo nascita-svezzamento, dovuto prevalentemente ad una ridotta vitalità ed a una minore maturità fisiologica dei suinetti (Yuan et al. 2015).

Per quanto riguarda la gestazione, un'adeguata vasculogenesi e angiogenesi è necessaria per garantire l'irrorazione sanguinea della placenta, indispensabile per il corretto sviluppo fetale. In tale ottica, recenti lavori hanno dimostrato come l'integrazione di Arg nella fase iniziale di gestazione della scrofa, possa favorire la sopravvivenza embrionale, il numero di nati ed il peso alla nascita (Gonçalves et al., 2016), così come una integrazione nelle fasi finali è associato alla riduzione di nati morti e sottopeso (Nuntapaitoon et al., 2018). Inoltre, l'Arg è coinvolta in molteplici processi fisiologici quali il metabolismo lipidico in gestazione e la produzione di poliammine e ossido nitrico (effetto stimolante per l'angiogenesi placentare) in qualità di precursore di tali processi (Wu et al., 2017).

Inoltre, seppure vadano consolidandosi le evidenze del legame tra il microbiota fecale della madre ed il microbiota intestinale del neonato, non si rilevano studi sull'influenza dell'Arg sulla struttura del microbiota intestinale della scrofa. Ren et al., 2014 ha osservato come, in topi supplementati con Arg e immunostimolanti, sia aumentata l'abbondanza dei Bacteroidetes a discapito, invece, dell'abbondanza dei Firmicutes. Studi *in vitro*, hanno evidenziato come l'Arg possa influenzare l'utilizzazione e il metabolismo amminoacidico da parte dei batteri intestinali del suino, riducendo il tasso di catabolismo amminoacidico (Dai et al. 2012).

L'obiettivo di questo studio è di verificare l'efficacia dell'aggiunta di L-Arg nella dieta di gestazione della scrofa sulla numerosità, caratteristiche e sopravvivenza della nidiata, oltre che sull'equilibrio microbico intestinale delle scrofe..

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in una scrofaia commerciale situata in Emilia-Romagna.

La prova ha coinvolto un totale di 205 scrofe (Landrace x Large White) divise in due gruppi sperimentali, bilanciati per ordine di parto (3,26 + 2,2 d.s. and 3,37 + 2,2 d.s: i) Gruppo controllo (CON) ha ricevuto la dieta di gestazione normalmente usata nell'allevamento (**Tabella 1**); ii) Gruppo trattato (ARG), ha ricevuto la stessa dieta del gruppo CON in cui però il contenuto di Arg è stato aumentato di 0,25%, mediante l'uso di L-Arg di sintesi. Un aumento di 0,25% nel mangime rientra nell'intervallo più favorevole per le prestazioni di gestazione riscontrabile nella letteratura attuale (Palencia et al., 2018).

La dieta è stata differenziata tra i due gruppi sperimentali dall'ingresso in box di fecondazione ed è stata somministrata con sistema automatico, per tutto il periodo gestazionale.

Tabella 1 - Ingredienti e composizione della dieta di gestazione delle scrofe del gruppo di controllo
Table 1 - Ingredients and composition of the sows' gestating control diet

Ingredienti	Unità di misura	Valore
Granoturco-mais	%	24,4
Crusca frumento	%	20,0
Orzo	%	14,0
Frumento	%	8,0
Trebbie essiccate di distilleria	%	8,0
Sorgo	%	7,0
Polpe barbabietola	%	6,5
Soia proteica	%	3,0
Seme di lino	%	2,5
Girasole 36% P.G.	%	2,0
Caco3 FINE	%	1,5
Int. Vit-min.	%	1,0
Grasso animale 8/10	%	1,0
Sale	%	0,4
Fosf.bicalcico 18%	%	0,3
L-lisina	%	0,26
Treonina	%	0,09
Colina hcl 75%	%	0,05
Energia Metabolizzabile calcolata	Kcal/kg	2950
Composizione analizzata		
Proteine grezze	%	14,7
Estratto etereo	%	5,1
Crude Fibre	%	5,4
Ceneri	%	5,1
Lisina	%	0,66
Arginina	%	0,72
Cistina	%	0,28
Metionina	%	0,22
Treonina	%	0,56
Triptofano	%	0,123
Valina	%	0,60
Isoleucina	%	0,46
Leucina	%	1,06
Tirosina	%	0,44
Fenilalanina	%	0,62
Istidina	%	0,41
Acido aspartico	%	0,92
Acido glutammico	%	2,83
Alanina	%	0,69
Glycina	%	0,81
Prolina	%	0,89
Serina	%	0,62
L_Arginina libera ²	%	Non rilevato
L-Lisina libera	%	0.219

Al parto, su tutte le scrofe è stato rilevato il peso della placenta e la morfologia del cranio dei suinetti utilizzando il metodo di punteggio codificato nel progetto Europeo PROHEALTH (Matheson et al. 2018), per distinguere eventuali suinetti che avessero subito una restrizione intrauterina della crescita (IUGR = intrauterine growth retardation). Sono inoltre stati raccolti i dati relativi alla numerosità della nidiata, mortalità e cause associate ad essa.

Su un sottogruppo di animali, 62 scrofe del gruppo CON e 63 scrofe del gruppo ARG bilanciato per ordine di parto, è stato registrato il peso individuale dei suinetti alla nascita (P0) e allo svezzamento (P1). Da questo sottogruppo sono state scelte 36 scrofe/dieta da cui è stato raccolto un tampone rettale prima del parto

Dai tamponi rettali è stato estratto il DNA batterico totale tramite kit di estrazione (FastDNATMSpin Kit for Soil, MP Biomedicals Europe, LLC) per effettuare la caratterizzazione del microbiota. Il profilo microbico è stato caratterizzato sequenziando le regioni V3-V4 del gene 16S rRNA. Per l'analisi bioinformatica, è stata utilizzata la pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) la tassonomia è stata assegnata usando come riferimento il Silva Database (release 132) (Quast et al. 2013).

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SAS versione 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

La procedura GLM è stata utilizzata per adattare le misure di peso e la durata della gestazione con un modello lineare che includeva come fattori la dieta, la classe di ordine di parto, la loro interazione e la banda, e per alcuni parametri delle covariate, quali il numero di nati vivi ed il numero di suini della nidiata post-adozione. I fattori banda e classe di parto sono stati rimossi dal modello quando non significativi.

Ai fini dell'analisi statistica le scrofe sono state raggruppate in classi di parto (1: primo parto; 2: secondo parto; 3: terzo parto; 4: quarto + quinto parto; 5: sesto in poi)

La procedura GENMOD è stata utilizzata con una distribuzione di Poisson e la funzione log per i dati di numerosità nelle nidiate e con una distribuzione binomiale e una funzione Logit per i tassi di mortalità e per altri rapporti percentuali sui valori di numerosità nelle nidiate. Il modello includeva come fattori la dieta, la classe di ordine di parto, la loro interazione e la banda, e per alcuni parametri delle covariate, quali la durata della gestazione ed il numero di suini della nidiata post-adozione.

Per il profilo microbico, le analisi statistiche su Alfa diversità, Beta diversità e composizione tassonomica sono state effettuate con software R v3.6, utilizzando i pacchetti PhyloSeq (McMurdie e Holmes 2013), Vegan (Dixon 2003) e lme4 (Bates et al., 2015).

Per l'Alfa diversità è stato utilizzato un modello ANOVA considerando come fattori l'ordine di parto diviso in categorie la banda e il trattamento (CON – ARG)

Per la Beta diversità è stato utilizzato un modello PERMANOVA (procedura “adonis”), considerando come fattori la categoria di parto, il trattamento e la banda e utilizzando come matrice di distanza Bray-Curtis.

Le differenze in composizione tassonomica tra i due gruppi (ARG e CON) sono state analizzate utilizzando il pacchetto DESeq2 basato su modelli lineari generalizzati binomiali negativi e che applica il metodo Benjamini-Hochberg per la correzione dei confronti multipli (Love, Huber, e Anders 2014).

RISULTATI

In **Tabella 2** sono riportati i dati di peso della placenta e della durata della gestazione per i due gruppi sperimentali, aggiustate per l'ordine di parto, la banda ed il numero di nati vivi. La dieta non ha influenzato i due parametri.

Tabella 2 – Peso della placenta e durata della gestazione nei due gruppi**Table 2** - Placenta weight and duration of gestation in the two groups.

	Dieta				Ordine parto	Banda	Nati vivi	
	CON	ARG	Err.S.M.	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	Coefficiente	<i>p</i>
Peso placenta, g	2748	2763	96,3	0,904	0,000 ¹	<,0001	194	<0,0001
Durata gestazione, gg	115,8	115,9	0,07	0,213	0,352	0,026	-0,0775	<0,0001

¹ Effetto dell'ordine di parto lineare e quadratico, ambedue $P < 0,001$.

In **Tabella 3** sono riportati i dati delle performance riproduttive della scrofa. La dieta ARG ha avuto un effetto statisticamente significativo sul numero di nati totali, maggiore nel gruppo ARG rispetto al CON ($p=0,043$) così come è stata evidenziata una tendenza sul numero di nati vivi, maggiore nel gruppo ARG rispetto al CON ($p=0,086$). Per la mortalità da 0 a 3 giorni di vita si è rilevata una tendenza positiva dell'effetto della dieta, con un minor numero di morti nel gruppo ARG rispetto al CON ($p=0,088$).

Per gli stessi parametri riportati però in percentuale, non ci sono state differenze statisticamente significative. È stata rilevata solo una tendenza sulla percentuale di IUGR (calcolata sul numero di nati vivi), che sono diminuiti nel gruppo ARG rispetto al CON ($p=0,098$).

Tabella 3 – Effetto della dieta arricchita in L-Arg sulle caratteristiche della nidiata dalla nascita allo svezzamento.**Table 3** – Effect of L-Arg supplementation on the litter characteristics from born to weaning.

	Dieta				Ordine parto	Banda
	CON	ARG	E.S.	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Nati vivi, n	12,58	13,40	0,03	0,125	-	-
Nati morti, n	0,76	0,96	0,112	0,117	-	-
Nati totali, n	13,39	14,43	0,03	0,043	0,107	-
Mummificati, n	1,37	1,56	0,09	0,244	<,0001	-
IUGR medi, n	0,05	0,04	0,502	0,602	0,798	0,001
IUGR lievi, n	0,13	0,07	0,349	0,101	0,023	0,617
IUGR totali, n	0,22	0,13	0,251	0,113	0,042	0,063
Morti 0 – 3 giorni, n	1,07	0,84	0,11	0,088	0,001	0,107
Morti 0-27 giorni, n	1,64	1,53	0,08	0,543	0,007	0,004
Svezziati totali, n	10,97	11,45	0,031	0,316	-	-
Nati morti/nati, %	5,73	6,75	0,115	0,260	-	-
IUGR/nati vivi, %	1,68	0,99	0,253	0,098	0,070	0,045
Mummificati/nati e mummificati, % ¹	9,35	9,82	0,090	0,656	<,0001	-
Morti da 0 a 3 d/tot. allattati post-adozioni, % ¹	8,32	6,84	0,112	0,172	0,010	
Morti tot./tot. allattati post-adozioni, % ¹	13,05	12,41	0,089	0,640	0,003	0,002

¹ I parametri sono stati significativamente influenzati dal numero di suinetti per nidiata post-adozione ($p < 0,05$).

In **Tabella 4** sono riportati i dati relativi alle performance della nidiata dalla nascita fino allo svezzamento. La dieta non ha influenzato il peso della nidiata e l'IPG durante tutto il periodo di prova.

Tabella 4 - Peso vivo della nidiata alla nascita e allo svezzamento ed incremento ponderale nei due gruppi.

Table 4 - Live weight of the litter at birth and weaning and daily weight gain in the two groups

Parametro	Dieta				Ordine parto	Banda	N suini post-adozione
	CON	ARG	E. S.	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Peso medio preadozione, kg	1,39	1,36	0,023	0,620	<0,0001	0,193	-
Peso nidiata preadozione, kg	17,81	18,19	0,476	0,574	0,007	0,916	-
Peso nidiata post-adozione, kg	17,18	17,59	0,360	0,420	<0,0001	0,643	-
Peso medio allo svezzamento, kg	6,29	6,31	0,082	0,880	0,004	0,837	0,027
Peso nidiata allo svezzamento, kg	68,90	69,08	1,536	0,933	<0,0001	0,170	<0,0001
Incremento ponderale giornaliero della nidiata, kg	2,23	2,27	0,064	0,681	<0,0001	0,110	0,0007

¹Relativo alle scrofe dei sottogruppi (CON, n = 63; ARG, n = 64).

Per quanto riguarda la caratterizzazione del profilo microbico, i valori di Alfa diversità (differenze all'interno del gruppo), Chao1, Shannon e Simpson sono riportati in **Tabella 5**. I dati non mostrano differenze significative tra i due trattamenti.

Per la Beta diversità la **Figura 2** mostra il grafico NMDS partendo da una matrice di distanza Bray-Curtis, dal grafico non si evince nessuna separazione netta tra i diversi trattamenti. Inoltre, il test Adonis non ha mostrato differenze significative per il fattore dieta **Tabella 6**.

Tabella 5 - Alfa diversità per gli indici Chao1, Shannon, Simpson.

Table 5 - Alpha diversity values for Chao1, Shannon, Simpson indexes.

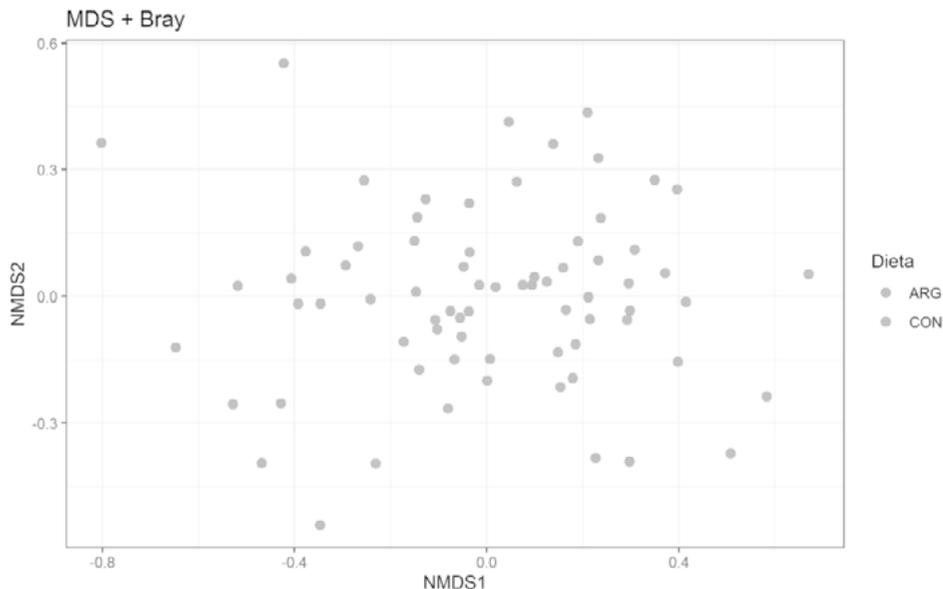
Indice Alfa	CON	ARG	SE	Df	<i>p</i>
Chao1	583	573	12	66	0,5609
Shannon	5,36	5,32	0,0577	66	0,5833
Simpson	0,9874	0,9857	0,00158	68	0,4597

Tabella 6 - Risultati test Adonis

Table 6 - Output of the Adonis test

	Gradi di libertà	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	Test F	R2	<i>p</i>
Dieta	1	0,1139	0,11385	0,68628	0,00971	0,923
Residui	70	11,6128	0,1659		0,99029	
Totale	71	11,7267			1	

Figura 2 - NMDS plot usando come matrice di distanza Bray-Curtis
Figure 2 - NMDS plot using Bray-Curtis as the distance matrix



Per quanto riguarda la composizione microbiologica, sono stati identificati un numero di ASV totale di 3011, distribuiti tra 21 diversi phyla, 30 classi, 85 famiglie, 212 generi, 71 specie diverse. A livello di genere quelli più comuni erano: *Rikenellaceae*, *Ruminococcaeae*, *Christensenellaceae* e *Treponema*. Tutte le differenze significative evidenziate da DEseq2 sono state riportate in **Tabella 7**.

Tabella 7 - Risultati DEseq2 per i diversi livelli tassonomici.
Table 7 - DEseq2 output for the different taxonomic levels

Taxa	Name	log2FC ¹	lfcSE	p	FDR
ASV	ASV_690	24,23	2,09	0,00	0,00
	ASV_215	-23,53	2,41	0,00	0,00
	ASV_294	-25,10	2,82	0,00	0,00
Classe	Negativicutes	-0,67	0,17	0,00	0,00
Ordine	Selenomonadales	-0,66	0,18	0,00	0,01
	Aeromonadales	-13,95	0,38	0,00	0,01
Famiglia	Bacteroidaceae	17,79	0,37	0,00	0,00
	Succinivibrionaceae	-13,95	0,37	0,00	0,01
	Acidaminococcaceae	-0,45	0,15	0,00	0,05
	Veillonellaceae	-18,47	0,62	0,00	0,05
Genere	<i>Bacteroides</i>	17,98	0,37	0,00	0,00
	<i>Succinivibrio</i>	-13,77	0,37	0,00	0,02

¹Log2FC: logarithmic fold change, indica il rapporto di espressione di un ASV tra due diverse condizioni (TRT e CON). Valori positivi indicano una ASV maggiormente espressa nel trattato, valori negativi maggiormente espressa nel controllo.

DISCUSSIONE

Le linee genetiche moderne sono caratterizzate da elevata prolificità, spesso a discapito dell'omogeneità di peso della nidiata e da un aumento dell'incidenza di suinetti IUGR. Negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato un possibile effetto favorevole dell'integrazione di Arg durante la gestazione nel migliorare le performance della scrofa e dei suinetti, aumentando il numero di nati vivi, il peso alla nascita e diminuendo la variazione di peso all'interno della nidiata (Gao et al. 2012; Gonçalves et al. 2016;). Nel nostro studio la supplementazione dello 0,25% di L-Arg in una dieta commerciale standard, che ha portato il livello di L-Arg totale allo 0,9%, per tutta la durata della gestazione, ha significativamente aumentato il numero di nati totali, tendenzialmente incrementato il numero di nati vivi e diminuito il tasso di mortalità nei primi 3 giorni dopo il parto, in accordo rispetto a quanto osservato da Gao et al. (2012); Gonçalves et al. (2016); Nuntapaitoon et al. (2018); Liu et al. (2012). Inoltre, si è osservata anche una tendenza sulla riduzione dell'incidenza di suinetti IUGR.

Contrariamente a quanto osservato da Nuntapaitoon et al. (2018) e Liu et al. (2012), nel nostro studio non è stato osservato alcun effetto dell'integrazione con L-Arg sul peso della nidiata alla nascita e allo svezzamento. Questo può essere spiegato dal fatto che negli studi citati è stata utilizzata una dose maggiore di L-Arg rispetto al presente studio. Ed inoltre nel nostro studio il gruppo CON ha ricevuto un livello base di Arg con la dieta standard dello 0,75%, che di per sé è già piuttosto elevato rispetto alle raccomandazioni proposte dall'NRC. Questo fattore potrebbe aver reso difficile evidenziare delle differenze tra i due gruppi per i fattori sopra elencati.

L'importanza del microbiota intestinale come fattore in grado di modulare lo sviluppo fisiologico e lo stato di salute dei suini sta diventando sempre più evidente. La struttura del microbiota intestinale è fortemente influenzata da numerosi fattori tra i quali la dieta (stimata del 57%) (Tomasello et al. 2014) it appears absolutely necessary to investigate the environmental factors favoring the onset of CRC and the promotion of colonic health. The gut microflora, or microbiota, has an extensive diversity both quantitatively and qualitatively. In utero, the intestine of the mammalian fetus is sterile. At birth, the intestinal microbiota is acquired by ingesting maternal anal or vaginal organisms, ultimately developing into a stable community, with marked variations in microbial composition between individuals. The development of IBD is often associated with qualitative and quantitative disorders of the intestinal microbial flora (dysbiosis). Pertanto, è ipotizzabile che l'integrazione della dieta con aminoacidi liberi, in questo l'Arg, possa avere un effetto sulla composizione del microbiota intestinale, così come già osservato in topi supplementati con questo AA e immunostimolanti (Ren et al., 2014). Nel nostro studio per quanto riguardo il profilo microbico intestinale delle scrofe, non sono state osservate differenze significative per gli indici di diversità microbica, ciò indica che l'Arg non ha alterato l'eubiosi intestinale delle scrofe. Analizzando nel dettaglio la composizione tassinomica del microbiota fecale delle scrofe, è stato però evidenziato come l'integrazione con L-Arg ha aumentato il numero di batteri appartenente alla famiglia delle Bacteroidaceae ed al genere *Bacteroides*. Questo risultato trova parzialmente riscontro nei dati riportati da Wu et al. (2011) che hanno osservato, nell'uomo, l'influenza di una dieta con elevati livelli di proteine animali e amminoacidi sulla consistenza della famiglia delle Bacteroidaceae.

CONCLUSIONI

In conclusione, l'integrazione dello 0,25% di Arg nella dieta della scrofa per l'intera durata della gestazione ha aumentato il numero di suinetti nati e non ha alterato il profilo microbico fecale delle scrofe. I risultati confermano che l'Arg è un AA essenziale per

sostenere le performance produttive della scrofa. Resta da chiarire se un'integrazione più elevata con questo AA possa avere un'influenza marcata sulle caratteristiche e la sopravvivenza della nidiata.

BIBLIOGRAFIA

1. Bates, Douglas, Martin Mächler, Ben Bolker, e Steve Walker. 2015. "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using Lme4". *J. Stat. Softw.* 67, 1–48.
2. Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, e Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data". *Nat. Methods.* 13, 581–83.
3. Dai, Zhao-Lai, Xi-Long Li, Peng-Bin Xi, Jing Zhang, Guoyao Wu, e Wei-Yun Zhu. (2012). "Regulatory Role for L-Arginine in the Utilization of Amino Acids by Pig Small-Intestinal Bacteria". *Amino Acids* 43, 233–44.
4. Dixon, Philip. 2003. "VEGAN, a Package of R Functions for Community Ecology". *J Veg Sci* 14, 927–30.
5. Gao, Kaiguo, Zongyong Jiang, Yingcai Lin, Chuntian Zheng, Guilian Zhou, Fang Chen, Lin Yang, e Guoyao Wu. (2012). "Dietary L-Arginine Supplementation Enhances Placental Growth and Reproductive Performance in Sows". *Amino Acids* 42, 2207–14.
6. Gonçalves, M. a. D., K. M. Gourley, S. S. Dritz, M. D. Tokach, N. M. Bello, J. M. DeRouche, J. C. Woodworth, e R. D. Goodband. (2016). "Effects of Amino Acids and Energy Intake during Late Gestation of High-Performing Gilts and Sows on Litter and Reproductive Performance under Commercial Conditions". *J Anim Sci* 94, 1993–2003.
7. Liu, X. D., X. Wu, Y. L. Yin, Y. Q. Liu, M. M. Geng, H. S. Yang, Francois Blachier, e G. Y. Wu. (2012). "Effects of Dietary L-Arginine or N-Carbamylglutamate Supplementation during Late Gestation of Sows on the MiR-15b/16, MiR-221/222, VEGFA and ENOS Expression in Umbilical Vein". *Amino Acids* 42, 2111–19.
8. Love, Michael I., Wolfgang Huber, e Simon Anders. (2014). "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2". *Genome Biol* 15, 550.
9. McMurdie, Paul J., e Susan Holmes. (2013) "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data". *PLOS ONE* 8, e61217.
10. Matheson, Stephanie M., Grant A. Walling, e Sandra A. Edwards. 2018. "Genetic selection against intrauterine growth retardation in piglets: a problem at the piglet level with a solution at the sow level", *Genet Sel Evol* 50, 46
11. Nuntapaitoon, Morakot, Ramon Muns, Peter K. Theil, e Padet Tummaruk. (2018) "L-Arginine Supplementation in Sow Diet during Late Gestation Decrease Stillborn Piglet, Increase Piglet Birth Weight and Increase Immunoglobulin G Concentration in Colostrum". *Theriogenology* 121, 27–34.
12. Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Pablo Yarza, Jörg Peplies, e Frank Oliver Glöckner. (2013) "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools". *Nucleic Acids Res* 41, 590–96.
13. Ren, Wenkai, Shuai Chen, Jie Yin, Jielin Duan, Tiejun Li, Gang Liu, Zemeng Feng, Bie Tan, Yulong Yin, e Guoyao Wu. (2014) "Dietary Arginine Supplementation of Mice Alters the Microbial Population and Activates Intestinal Innate Immunity". *J Nutr* 144, 988–95.

14. Tomasello, Giovanni, Pietro Tralongo, Provvidenza Damiani, Emanuele Sinagra, Benedetto Di Trapani, Marie Noelle Zeenny, Inaya Hajj Hussein, Abdo Jurjus, e Angelo Leone. (2014). "Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes". *World J Gastroentero* 20, 18121–30.
15. Wu, Gary D., Jun Chen, Christian Hoffmann, Kyle Bittinger, Ying-Yu Chen, Sue A. Keilbaugh, Meenakshi Bewtra, et al. (2011) "Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes". *Science (New York, N.y.)* 334, 105–8.
16. Wu, Guoyao, Fuller W. Bazer, Gregory A. Johnson, Cassandra Herring, Heewon Seo, Zhaolai Dai, Junjun Wang, Zhenlong Wu, e Xiaolong Wang. (2017) "Functional Amino Acids in the Development of the Pig Placenta". *Molec Reprod Dev* 84, 870–82.