



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**



NÍVEIS DE ENERGIA E NUTRIENTES PARA FRANGOS DE CORTE: DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E EXPRESSÃO GÊNICA

JORGE LUÍS DE LISBOA DUTRA

Mestrado

2016

PROZOOTEC-PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



JORGE LUÍS DE LISBOA DUTRA

**NÍVEIS DE ENERGIA E NUTRIENTES PARA FRANGOS DE CORTE:
DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia na área de Nutrição Animal como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador:

Profº. Drº. Claudson Brito Oliveira

Coorientadora:

Profª. Drª. Roberta Pereira Miranda Fernandes

**SÃO CRISTÓVÃO-SE
2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

D978n Dutra, Jorge Luís de Lisboa
Níveis de energia e nutrientes para frangos de corte :
desempenho, rendimento de carcaça e expressão gênica / Jorge
Luís de Lisboa Dutra ; orientador Claudson Oliveira Brito – São
Cristovão, 2016.
37 f. :il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal
de Sergipe, 2016.

1. Aminoácidos na nutrição animal. 2. Frango de corte. 3.
Minerais na nutrição. 4. Expressão gênica. I. Brito, Claudson
Oliveira, orient. II. Título.

CDU 636.5.084.52

JORGE LUÍS DE LISBOA DUTRA

**NÍVEIS DE ENERGIA E NUTRIENTES PARA FRANGOS DE CORTE:
DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia na área de Nutrição Animal como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.


APRESENTADA em 29 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Claudson Brito Oliveira (UFS)



Prof.ª Dr.ª Ana Paula Del Vesco (UFS)



Prof. Dr. Hunaldo Oliveira Silva (IFS)

SÃO CRISTÓVÃO-SE
2016

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1. Energia em rações para frangos de corte	2
2.2. Relações energia:nutriente em rações para frangos de corte	4
2.2.1. Relação energia:aminoácidos	4
2.2.2. Relação energia:minerais.....	6
2.3. Cadeia Respiratória.....	7
2.3.1. Cadeia Respiratória e Desempenho de Frangos de Corte	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
Efeito de níveis energéticos e nutrientes dietéticos sobre o desempenho e expressão de genes da cadeia respiratória no fígado de frangos de corte	15
Resumo	15
Introdução	17
Material e Métodos	18
Resultados.....	21
Discussão	22
Referências	25

RESUMO

DUTRA, Jorge Luís de Lisboa. **Níveis de energia e nutrientes para frangos de corte: desempenho, rendimento de carcaça e expressão gênica.** Sergipe: UFS, 2016. 37p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia)

RESUMO: Objetivou-se com o presente estudo, avaliar os efeitos de níveis energéticos e ajustes de nutrientes (lisina, cálcio e fósforo) sobre o desempenho, rendimento da carcaça e na expressão de genes relacionados com a cadeia transportadora de elétrons (CTE) no fígado de frangos de corte dos 22 aos 42 dias de idade. Um total de 432 frangos de corte, machos, Cobb 500 foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado em três tratamentos com oito repetições de dezoito aves por unidade experimental. O primeiro, tratamento controle (Ctrl), consistiu numa ração a base de milho e farelo de soja, contendo energia metabolizável (EM) de 3025 kcal/kg. O segundo tratamento (Ctrl + EM) foi obtido com o aumento de 150 kcal/kg no valor de EM em relação a ração controle, mantendo os valores de lisina digestível, cálcio (Ca) e fósforo disponível (AP). No terceiro tratamento (EM + CN), foi aumentado o valor de EM (150 kcal/kg) em relação a ração controle e os nutrientes lisina digestível, Ca e AP foram ajustados proporcionalmente ao aumento energético. O desempenho e os rendimentos da carcaça das aves foram analisados. Além disso, foram analisadas as expressões dos genes *ND1* e *COX1*. Os tratamentos proporcionaram efeitos significativos sobre o desempenho, o que não foi observado para rendimento de carcaça. Verificou-se que o aumento na energia metabolizável da ração proporcionou maior eficiência alimentar em relação ao tratamento controle. Em comparação com o grupo controle, quando se aumentou a energia e corrigiu os nutrientes, observou-se melhora no ganho de peso. A expressão dos genes da CTE (*ND1* e *COX1*) não diferiram entre os tratamentos. Em conclusão, os resultados indicam que rações mais energéticas e a correção dos nutrientes promovem melhora no desempenho de frangos de corte (22-42d), mas não alteram os rendimentos de carcaça e a expressão de genes da CTE.

Palavras-chave: aminoácidos, minerais, mitocôndria, expressão gênica

ABSTRACT

DUTRA, Jorge Luís de Lisboa. **Energy levels and nutrients for broilers: performance, carcass yield and gene expression.** Sergipe: UFS, 2016. 37p. (Dissertation – Master in Zootechny)

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of energy levels and nutrient adjustments (lysine, calcium and phosphorus) on the performance, carcass yield and expression of genes related to the electron transport chain (ETC) in chicken liver cut from 22 to 42 days old. A total of 432 broiler chickens, male, Cobb 500 was distributed in a completely randomized design in three treatments with eight replicates eighteen birds each. The first treatment control (Ctrl), consisted of a feed based on corn and soybean meal containing metabolizable energy (EM) of 3025 kcal/kg. The second treatment (Ctrl+EM) were obtained increasing 150 kcal/kg in the amount of EM compared to control diet, keeping the values lysine, calcium (Ca) and phosphorus available (AP). In the third treatment (EM + CN), there was increase the value of EM (150 kcal/kg) compared to control diet and nutrients lysine, Ca and P were adjusted proportionally to the energy increase. The performance and yields of carcass parts of the birds were analyzed. Furthermore, the expressions of *ND1* and *COX1* gene were analyzed. The treatments provided significant effects on performance, which was not observed for yield of carcass parts. It was found that the increase in metabolizable energy of feed provided greater feed efficiency compared to control treatment. Compared with the control group, when it increased the energy and corrected the nutrients, improvement was observed in weight gain. The expression of genes of CTE (*ND1* and *COX1*) did not differ between treatments. In conclusion, the results indicate that more energy rations and correction of nutrients promote improved performance of broilers (22-42d), but do not change the yield of carcass parts and the expression of genes of CTE.

Keywords: amino acids, minerals, mitochondria, gene expression

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem se destacado no mercado internacional, sendo o segundo maior produtor mundial de carne de frango e ocupando desde 2004 a liderança na exportação deste produto (United States Department of Agriculture - USDA, 2015). No Brasil, a produção de carne de frango chegou a 13,146 milhões de toneladas em 2015. Deste volume total produzido pelo país, 67,3 % foi destinado ao consumo interno, atingindo mais de 43 quilos de consumo per capita. Neste sentido, a carne de frango tem sido a mais consumida no Brasil (Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA, 2015). Em 2015, o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES, 2015) estima que foram produzidas cerca de 66,3 milhões de toneladas de ração para utilização na produção animal brasileira. Deste total, 32,4 milhões de toneladas de ração foram destinadas à área de frangos de corte, caracterizando o segmento da produção animal que demanda mais insumos deste tipo no Brasil.

Investimentos em pesquisas nas áreas de genética, nutrição e manejo vêm permitindo o aumento na produtividade dos frangos de corte. Na área da nutrição, as concentrações de aminoácidos, minerais e energia demandam atenção durante a formulação de uma ração para frangos de corte por interferirem no custo da ração, no desempenho e na carcaça das aves.

O aminoácido lisina e os minerais cálcio e fósforo são, entre outros, nutrientes que precisam estar em quantidades adequadas na ração para dar suporte ao crescimento das aves. Assim, é importante ajustar proporcionalmente estes nutrientes quando se aumenta o nível energético das rações, evitando a deposição excessiva de gordura e mantendo a taxa de crescimento (LEESON; SUMMERS, 2001).

Tem sido demonstrado o efeito benéfico de rações mais energéticas e dos nutrientes lisina, cálcio e fósforo sobre as características de desempenho e carcaça das aves (HIDALGO et al., 2004; VENÄLÄINEN et al., 2006; DOZIER et al., 2011). Além disso, busca-se através de pesquisas mais conhecimento acerca dos efeitos da relação energia:nutriente sobre mecanismos moleculares da produção energética mitocondrial. Em frangos de corte a relação proteína:energia está associada ao funcionamento da mitocôndria (TOYOMIZU et al., 1992) e a disponibilidade de energia dietética está relacionada com a expressão de genes mitocondriais (WANG et al., 2012). Além disso, foi visto que existe relação entre o desempenho e expressão de genes mitocondriais em frangos de corte (BOTTJE et al., 2002; IQBAL et al., 2004; OJANO-DIRAIN et al., 2007). Sendo assim, melhoras na eficiência alimentar, estimuladas pelos níveis energéticos e concentrações de aminoácidos e minerais, podem estar relacionadas com a expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons (CTE).

Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos de níveis energéticos e nutrientes dietéticos (lisina, cálcio e fósforo) sobre a expressão de mRNA *COXI* e *NDI* da CTE, bem como a relação com o desempenho de frangos de corte (22 – 42d).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Energia em rações para frangos de corte

Os carboidratos, gorduras e proteínas na ração são as fontes de energia requerida pelos animais para atividades físicas vitais, manutenção da temperatura corporal e crescimento de tecidos corporais (NELSON; COX, 2008). Para frangos de corte, a necessidade energética varia em função de fatores como idade, taxa de crescimento e fatores ambientais como a temperatura (ROSTAGNO et al., 2011).

Tem sido demonstrado os efeitos positivos do aumento na energia dietética sobre o desempenho, influenciando o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte (DOZIER et al., 2011; HIDALGO et al., 2004; PLAVNIK et al., 1997), porém quando se trata do consumo de ração, é bastante discutido a regulação dos frangos de corte em função da concentração energética da ração. Já foi reportado que os frangos de corte não regulam a ingestão de alimento em função da concentração energética da ração (PLUMSTEAD et al., 2007; RICHARDS; PROSZKOWIEC-WEGLARZ, 2007). Dozier et al. (2011) avaliaram seis rações para frangos de corte machos (36-47d), variando a concentração de energia metabolizável corrigida para nitrogênio de 3140 a 3240 kcal/kg com incrementos de 20 kcal/kg. Os autores não observaram variação significativa para consumo de ração entre os tratamentos, entretanto, verificaram melhora no ganho de peso e na conversão alimentar à medida que houve incremento energético.

Uma estratégia utilizada para aumentar a energia em rações para frangos de corte é a adição de lipídeos, pois as gorduras e óleos geram cerca de 9,4 kcal de energia bruta por grama, enquanto as proteínas e amido produzem, respectivamente, 5,5 e 4,2 kcal de energia bruta por cada grama (LEESON; SUMMERS, 2001).

Segundo Golian e Maurice (1992) e Leeson, Caston e Summers (1996), o aumento da energia em rações para aves, através da adição de lipídeos pode contribuir para melhorar a digestibilidade dos nutrientes. A fim de verificar o efeito da adição de gorduras sobre a digestibilidade de nutrientes, Kim et al. (2013) adicionaram 5 % de gordura em rações para frangos de corte na fase final, aumentando 270 kcal/kg na energia metabolizável aparente (EM) em relação ao controle (EM = 3000 kcal/kg). Observou-se que as aves alimentadas com a ração

teste (EM = 3270 kcal/kg) apresentaram melhora na digestibilidade da proteína e da gordura dietética.

A presença de ácidos graxos no trato gastrointestinal das aves aumenta o tempo de retenção do alimento (HONDA et al., 2009; KIM et al., 2013; MATEOS; SELL; EASTWOOD, 1982), podendo favorecer maiores atividades das enzimas digestivas e consequentemente o aumento na digestibilidade dos nutrientes (DANICKE et al., 1999). Os ácidos graxos podem inibir o esvaziamento gástrico quando atingem o duodeno (MCDONALD et al., 2010), sendo esta inibição mediada por mecanismos neurais e hormonais (REECE, 2009). O mecanismo neural envolve ação de neurônios inibitórios que fazem sinapse com as fibras do sistema nervoso parassimpático enviando sinais para as células G do intestino. Em seguida, o mecanismo hormonal age liberando hormônios na corrente sanguínea, os quais promovem retardo no esvaziamento gástrico.

Dentre os hormônios reguladores da esvaziamento gástrico de aves, o colecistoquinina (CCK) é o mais estudado (DENBOW, 2015). A injeção intravenosa de CCK em aves tem mostrado efeito sobre a redução da motilidade da moela e estímulos de atividade do duodeno (MCDONALD et al., 2010; SAVORY; DUKE; BERTOY, 1981). Em adição, Martínez et al. (1993) demonstraram que o hormônio CCK inibe a motilidade do estômago das aves e aumenta a atividade no duodeno com influências nas contrações dos segmentos, retardando o esvaziamento gástrico.

Outro efeito da adição de lipídeos em rações para aves é a redução do incremento calórico, aumentando a energia líquida (LEESON; SUMMERS, 2001). O incremento calórico consiste na elevação da taxa metabólica que ocorre depois de uma fração alimentar ser absorvida no trato digestório (BLEM, 1999). Também conhecido como efeito dinâmico específico, este incremento varia em função da composição dos alimentos, sendo menor quando a energia metabolizável é derivada de gordura (15 %) em comparação com as energias derivadas dos carboidratos (21 %) e proteínas (32 %) (CARRÉ; LESSIRE; JUIN, 2014). Portanto, como a energia líquida é a diferença entre energia metabolizável e o incremento calórico, quando este incremento é reduzido, maior é a energia líquida disponível para as atividades de manutenção e produção. Fuller e Rendon (1977) avaliaram o efeito da inclusão de óleo de milho na ração para frangos de corte (28-49 d), mantendo o mesmo valor de EM (3100 kcal/kg) que o grupo controle, a qual teve a maior parte da energia oriunda de glicose monohidratada. A quantidade de caloria oriunda dos lipídeos na ração foi aumentada de 6,24 (ração controle) para 35,2 % (ração teste). Os autores observaram que o incremento calórico nas aves foi diminuído quando os níveis de ácidos graxos foram aumentados na ração, melhorando a eficiência alimentar e a

eficiência calórica que consiste na relação entre a energia bruta retida e a energia metabolizável consumida.

Apesar dos benefícios citados, o aumento na energia dietética pode acarretar em maior deposição de gordura abdominal nas aves (LEESON et al., 1996). A energia dietética disponível que excede a necessidade para as atividades metabólicas e crescimento normal do animal não pode ser excretada pelo organismo, sendo normalmente estocada como gordura (LEESON; SUMMERS, 2001).

2.2. Relações energia:nutriente em rações para frangos de corte

Em rações para frangos de corte, quando aumenta-se o nível energético da ração é necessário manter o equilíbrio de nutrientes como aminoácidos e minerais, evitando a deposição de gordura em excesso e mantendo a taxa de crescimento (LEESON; SUMMERS, 2001).

2.2.1. Relação energia:aminoácidos

Os aminoácidos são necessários para a síntese das proteínas e de outros metabólitos especiais. Para síntese proteica, é necessário que os aminoácidos estejam presentes na ração em concentrações adequadas, pois a deficiência de pelo menos um deles pode limitar a síntese (LEESON; SUMMERS, 2001). No entanto, se os aminoácidos estiverem em desequilíbrio ou se a ração apresentar um desequilíbrio na relação energia:proteína, a fração proteica excedente sofrerá desaminação, pois o organismo animal não pode estocar aminoácidos como reserva. Este processo de desaminação demanda gasto energético o que acarretará em perda de eficiência do animal. Além disso, o incremento calórico poderá demandar mais energia para a manutenção de homeostasia térmica do animal, reduzindo a energia líquida para produção (ANDRIGUETTO et al., 2002).

Portanto, o equilíbrio dos aminoácidos na ração é importante para manutenção do desempenho animal. Dentre os aminoácidos, a lisina se destaca como o principal a ser incorporado no tecido muscular por participar em menor proporção de outras vias metabólicas (GARCIA; BATAL; BAKER, 2006). Dessa forma, utiliza-se a lisina como referência para manter as relações entre os aminoácidos na ração em busca de oferecer suporte para deposição proteica e ganho de peso.

A deposição de proteína depende da dinâmica de síntese e degradação dessas moléculas, processo denominado turnover proteico. Neste sentido, o aumento na deposição de proteína é resultado do aumento na síntese, redução na degradação ou mudanças em ambos os componentes (BUTTERY; LINDSAY, 1980). Em frangos de corte jovens selecionados para

crescimento rápido, alimentados com quantidades adequadas de aminoácidos, a taxa de degradação pode alcançar entre 30 e 40 % da taxa de síntese proteica (LEESON; SUMMERS, 2001).

O aumento no ganho de peso das aves ocorre principalmente pela deposição de proteína, gordura e água. No entanto, é a deposição de proteína que está mais associada ao ganho de peso (BOEKHOLT et al., 1994), pois para cada grama de proteína depositada ocorre retenção de três gramas de água (LEENSTRA, 1986), enquanto o tecido adiposo contém cerca de 20 % de água (WANG; PIERSON, 1976). Para Leeson e Summers (2001), as aves que consomem rações com mais aminoácidos, desde que ajustados, têm a tendência de depositar mais proteína, havendo um limite genético.

O processo de deposição proteica demanda muita energia, sendo necessário 0,7 kcal para deposição de um grama de proteína (BUTTERY; BOORMAN, 1976), portanto, é necessário que o animal disponha de um aporte energético adequado. Em contrapartida, se o animal tiver energia disponível e não possuir aminoácidos para sintetizar a proteína, o excesso dessa energia será direcionado para deposição de gordura. Silva, Albino e Nascimento (2001) avaliaram, em frangos de corte machos (22-42 d), o efeito de três níveis de EM (2900, 3100 e 3300 kcal/kg) e relações energia:proteína de 128, 148, 168 e 188 kcal por (%) de proteína bruta (PB), mantendo as proporções aminoácidos e dos minerais cálcio e fósforo. Os autores observaram que o aumento da relação EM:PB apresentou efeito linear decrescente sobre ganho de peso e elevou linearmente a porcentagem de gordura abdominal na carcaça.

No geral, a gordura da carcaça e abdominal não são alteradas desde que a relação caloria:proteína seja constante (DOZIER et al., 2011; HIDALGO et al., 2004); se essa relação não for mantida, a gordura da carcaça tende a aumentar quando eleva-se o nível energético da ração (LEESON et al., 1996). O aumento da EM em rações formuladas com concentrações ajustadas de aminoácidos tem mostrado melhoras na conversão alimentar e taxa de crescimento sem afetar a deposição de gordura abdominal entre os tratamentos (HIDALGO et al., 2004; SALEH et al., 2004).

Leeson et al. (1996) avaliaram quatro rações com diferentes teores energéticos (2700, 2900, 3100 e 3300 kcal/kg de EM) para frangos de corte do primeiro ao 49º dia e observaram melhora na conversão alimentar com o aumento na energia dietética, além do aumento na deposição de gordura abdominal. Esse aumento de gordura abdominal pode ser reflexo do período de fornecimento da ração (1-49 d) e das diferenças entre as energias dietéticas (200 kcal/kg) sem os ajustes dos nutrientes como aminoácidos e minerais.

Realizando os ajustes da relação caloria:proteína e aminoácidos, Hidalgo et al. (2004) forneceram rações para frangos de corte com diferentes níveis energéticos e observaram melhora na conversão alimentar das aves com aumento da energia. Além disso, não se observou diferenças para porcentagem de deposição de gordura abdominal entre os níveis energéticos extremos, sendo a diferença de 220 kcal/kg de EM nas rações para as três fases de criação: inicial, crescimento e final. O resultado foi atribuído à manutenção das relações entre o nível de energia e os aminoácidos. Em adição, Saleh et al. (2004) verificaram melhora na conversão alimentar de frangos de corte sem afetar a deposição de gordura abdominal com a adição de até 6 % de gordura de aves, mantendo a concentração de nutrientes nas rações durante o período de produção (63 d).

A fim de avaliar o efeito da EM em rações para frangos de corte (42-49 d), machos e fêmeas, Skinner, Waldroup e Waldroup (1992) formularam rações contendo EM entre 3080 e 3465 kcal/kg de ração com incrementos de 55 kcal entre os tratamentos. No experimento, os níveis de aminoácidos (lisina, sulfurados e arginina) e dos minerais (Ca e P) foram mantidos em relação à energia. Observou-se melhora na conversão alimentar e redução na porcentagem de gordura abdominal das aves com o aumento da EM e ajuste dos nutrientes.

2.2.2. Relação energia:minerais

Nutrientes como os minerais cálcio (Ca) e o fósforo (P) são de extrema importância nutricional para frangos de corte (MCDONALD et al., 2010), pois são importantes para reações metabólicas, assim como para manter a estrutura óssea e reduzir os problemas de locomoção das aves (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013). O cálcio é o mineral mais abundante no corpo, sendo encontrado em sua maior parte nos ossos (MCDOWELL, 2003) e sua deficiência em frangos de corte pode resultar no retardo do crescimento (LEESON; SUMMERS, 2001). O fósforo, por sua vez, tem papel importante no desenvolvimento do esqueleto, além de participar do metabolismo energético, fazendo parte da molécula carreadora de energia, adenosina trifosfato (ATP), e de outras atividades metabólicas envolvendo carboidratos, proteínas, lipídeos, transporte de ácidos graxos e de outras moléculas lipídicas (MCDOWELL, 2003).

Em virtude do estreitamento das relações entre o Ca e o P, principalmente no metabolismo ósseo, existe a necessidade de se trabalhar com relações cálcio:fósforo disponível próximas de 2:1 em rações para frangos de corte (NRC, 1994; RAMA RAO et al., 2003). A necessidade por Ca e P é um fator importante em aves selecionadas geneticamente para crescimento rápido, onde os ossos são menos mineralizados e mais porosos que as aves rústicas (WILLIAMS et al., 2000).

As exigências de fósforo e cálcio pelas aves dependem da taxa de ganho de peso, sendo correlacionadas positivamente (ROSTAGNO et al., 2011). Assim, torna-se importante aumentar os níveis de Ca e P para permitir um melhor desenvolvimento esquelético, suportando o ganho de peso quando eleva-se o nível energético da ração (LEESON; SUMMERS, 2001).

Autores discordam do efeito dos níveis energéticos sobre a mineralização dos ossos em frangos de corte de crescimento rápido. Leterrier et al. (1998) avaliaram o efeito de duas rações com diferentes concentrações energéticas (EM = 2300 kcal/kg e 3180 kcal/kg) sobre a mineralização da tíbia de frangos de corte selecionados para crescimento rápido e não verificaram diferenças entre os tratamentos. Em contradição, Venäläinen et al. (2006) observaram que os frangos de corte (36 d) alimentados com a ração mais energética (EM = 2870 kcal/kg), em comparação com o controle (EM = 2630 kcal/kg), tiveram tíbias significativamente maiores, mais largas e pesadas, porém com menores concentrações de cinzas, Ca e P. Verificou-se ainda que ao aumentar os níveis de Ca e P nas rações, houve incremento em suas concentrações na tíbia. Em adição, Onyango et al. (2003) avaliaram três rações isoenergéticas e isoproteicas contendo diferentes concentrações de Ca e P (5,1:4,0; 6,0:5,1 e 10:7,8 para as rações com baixa, média e adequada exigência, respectivamente), mantendo a relação Ca:P total. Os autores verificaram que houve aumento do conteúdo e concentração de minerais na tíbia de frangos de corte com o incremento de Ca e P nas rações.

2.3. Cadeia Respiratória

Todas as etapas na degradação aeróbia de carboidratos, lipídeos e aminoácidos convergem na cadeia respiratória para síntese de ATP. A cadeia respiratória consiste em cinco complexos: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (Ubiquinona: citocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo c oxidase) e o complexo V (ATP sintase). Além dos cinco complexos, existem ainda duas moléculas carreadores de elétrons, a coenzima Q e o citocromo C (NELSON; COX, 2008).

Os elétrons podem entrar na cadeia transportadora de elétrons (CTE) através do complexo I ou do complexo II, dependendo do substrato. Se o substrato for ligado à Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), como malato e o piruvato, os elétrons entrarão no complexo I. Porém, se o substrato for ligado à Flavina Adenina Dinucleotídeo (FADH₂), como o succinato, os elétrons terão a entrada no complexo II. A coenzima Q (ubiquinona), por sua vez, transporta os elétrons destes dois complexos (I e II) para o complexo III. O intermediário citocromo C conduz os elétrons do complexo III para o IV. No complexo IV ocorre a transferência de elétrons da cadeia para o aceptor final (oxigênio), o qual liga-se aos prótons formando água. Nesta cadeia,

o fluxo de prótons entre as membranas produz um potencial eletroquímico que cruza a membrana mitocondrial interna, conservando a energia liberada pelas reações de transferência de elétrons. A membrana mitocondrial é impermeável para os prótons, sendo que estes podem retornar para a matriz apenas através de canais específicos para prótons (unidade F₀ do complexo V). A força próton-motriz que conduz o retorno destes prótons fornecem a energia para síntese de ATP a partir da fosforilação da adenosina difosfato (ADP) catalisada pela unidade F₁ do complexo V associado com a unidade F₀ (NELSON; COX, 2008).

Os complexos proteicos NADH desidrogenase e citocromo c oxidase são moléculas que fazem parte da cadeia respiratória mitocondrial. As NADH desidrogenase fazem parte do complexo I, sendo responsável pela transferência de elétrons e bombeamento de prótons na membrana mitocondrial interna a partir de substrato ligados ao NADH. As proteínas citocromo c oxidase fazem parte do complexo IV da CTE e são responsáveis pela transferência de elétrons e bombeamento de prótons, além de transferir uma parte dos hidrogênios para oxigênio formando água.

2.3.1. Cadeia Respiratória e Desempenho de Frangos de Corte

As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte da energia para a célula (NELSON; COX, 2008), assim, algumas variações no desempenho do crescimento de frangos podem ser devido às diferenças na função mitocondrial. Dessa forma, alterações nas moléculas do complexo respiratório podem interferir no funcionamento da cadeia respiratória e consequentemente na eficiência energética da mitocôndria. Estas alterações podem ser observadas nas pesquisas através de reações bioquímicas ou analisando a expressão de genes relacionados à CTE.

Bottje et al. (2002) verificaram que a eficiência alimentar de frangos de corte está diretamente relacionada com as atividades dos complexos I e II da cadeia respiratória em mitocôndrias dos músculos do peito e da perna. Outros também verificaram diferenças das atividades dos complexos I, II, III e IV da CTE nas mitocôndrias do peito (IQBAL et al., 2004) e do fígado (IQBAL et al., 2005) de frangos selecionados para eficiência em conversão de alimentos. Os galos com melhores eficiências, apresentaram maiores atividades dos complexos, sendo que as diferenças foram mais divergentes no complexo IV. Os resultados sugerem que a eficiência alimentar está associada diretamente com a atividade do complexo respiratório na mitocôndria.

Alterações da expressão de genes relacionados com a CTE em tecidos de aves já foram associadas à eficiência na conversão do alimento (BOTTJE; CARSTENS, 2009). Pesquisas

sobre a expressão de proteínas da cadeia respiratória em células do músculo e fígado não possuem um padrão consistente entre frangos com diferentes eficiências alimentar, provavelmente em virtude de muitos outros fatores como proteínas de transporte e desacoplamento (BOTTJE et al., 2006). Por essa razão, estudos têm sido conduzidos para identificar genes candidatos que possuem expressão diferenciada entre frangos de alta e baixa eficiências (BOTTJE; CARSTENS, 2009).

Iqbal et al. (2002) observaram que a expressão de mRNA *COX 2* foi reduzida no fígado das aves menos eficientes. Em adição, Ojano-Dirain et al. (2007), avaliaram a expressão de genes da CTE no músculo do peito de frangos de corte e observaram menor expressão *COX 3* nas aves com menores eficiências alimentar. Neste mesmo trabalho, não foram observadas diferenças para *COX 3* na mucosa do duodeno, justificando dessa forma que o tipo de metabolismo em cada tecido interfere na expressão dos genes.

Alterações das rações sobre a eficiência alimentar de animais têm efeitos sobre o funcionamento da mitocôndria que podem depender de uma variedade de fatores, incluindo tecido, espécie e tipo de alteração na ração. Manipulações nos níveis energéticos e de nutrientes em rações para ratos (LIU et al., 2014) e para frangos de corte (TOYOMIZU et al., 1992; WANG et al., 2012) podem provocar alterações na cadeia respiratória das células hepáticas. Toyomizu et al. (1992) verificaram que o aumento da proteína como constituinte da EM (7, 25, 43 e 61 %) em ração para frangos de corte (14 - 35d) reduziu a eficiência de síntese de ATP, mas não teve efeito na taxa de respiração ativa nas mitocôndrias hepáticas. No mesmo trabalho, o aumento da proteína provocou o aumento na deposição proteica e redução do teor de lipídeos na carcaça, podendo inferir que o excesso de energia, sem a disponibilidade de aminoácidos para sintetizar a proteína, foi direcionado para deposição de gordura. Por sua vez, Wang et al. (2012) avaliaram o efeito da restrição energética (limitação no consumo de ração) para frangos de corte, dos 18 aos 49 dias de idade e nas aves que sofreram restrição energética, observou-se redução na expressão de mRNA da NADH desidrogenase da subunidade I (*NDI*) no tecido hepático.

A regulação celular da fosforilação oxidativa é uma rede complexa, com numerosas etapas capazes de interferir no funcionamento mitocondrial e que podem ser afetadas por moléculas sinalizadoras, como o fósforo (BOSE et al., 2003). Bose et al. (2003) estudaram os efeitos do fósforo inorgânico em algumas etapas da fosforilação oxidativa em mitocôndrias cardíacas de suínos e mostraram que o fosfato regulou a fosforilação oxidativa em vários pontos, incluindo a geração de NADH e diretamente como um substrato para formação de ATP no complexo V. Porém, mesmo aumentando a geração de ATP, as variações não permitiram

grandes variações nas concentrações de energias livres dos intermediários metabólicos envolvidos neste processo.

Assim, são necessários estudos aprofundados que possibilitem maiores esclarecimentos a respeito de como a concentração de energia e de nutrientes podem influenciar a expressão de genes relacionados à fosforilação oxidativa e de como essas informações de expressão diferencial podem ser traduzidas em eficiência alimentar.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual ABPA 2015**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>. Acesso em 27 jan. 2016.

ADEDOKUN, S. A.; ADEOLA, O. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 600-608, 2013.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal: bases e fundamentos**. São Paulo: Nobel, 2002. 396p.

BLEM, C. R. Energy Balance. In: WHITTOW, G. C. (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. 5. ed. USA: Academic Press, 1999. cap. 13, p.327-341.

BOEKHOLT, H. A. et al. Effect of dietary energy restriction on retention of protein, fat and energy in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 35, n. 4, p. 603-614, 1994.

BOSE, S. et al. Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 278, n. 40, p. 39155-39165, 2003.

BOTTJE, W. et al. Feed Efficiency and Mitochondrial Function. **Poultry Science**, v. 85, n. 1, p. 8-14, 2006.

BOTTJE, W. G.; CARSTENS, G. E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of animal science**, v. 87, n. 14, p. 48-63, 2009.

BOTTJE, W. G. et al. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry Science**, v. 81, n. 4, p. 546-555, 2002.

BUTTERY, P. J.; BOORMAN, K. N. Energetic efficiency of amino acid metabolism. In: COLE, D. J. A.; BOORMAN, K. N., et al (Ed.). **Protein nutrition and metabolism**. London, UK: Publication European Association Animal Production, 1976. p.197-206.

BUTTERY, P. J.; LINDSAY, D. B. **Protein Deposition in Animals**. Woburn, Massachusetts: Butterworth Publishers, 1980. p.

CARRÉ, B.; LESSIRE, M.; JUIN, H. Prediction of the net energy value of broiler diets. **Animal**, v. 8, n. 09, p. 1395-1401, 2014.

DANICKE, S. et al. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium. on transit time of feed, and on nutrient digestibility. **Poultry Science**, v. 78, n. 9, p. 1292-1299, 1999.

DENBOW, D. M. Gastrointestinal Anatomy and Physiology. In: SCANES, C. G. (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. 6. ed. USA: Academic Press, 2015. cap. 14, p.337-366.

DOZIER, W. A. et al. Apparent metabolizable energy needs of male and female broilers from 36 to 47 days of age. **Poultry Science**, v. 90, n. 4, p. 804-814, 2011.

FULLER, H. L.; RENDON, M. Energetic efficiency of different dietary fats for growth of young chicks. **Poultry Science**, v. 56, n. 2, p. 549-557, 1977.

GARCIA, A. R.; BATALLA, A. B.; BAKER, D. H. Variations in the digestible lysine requirement of broiler chickens due to sex, performance parameters, rearing environment, and processing yield characteristics. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 498-504, 2006.

GOLIAN, A.; MAURICE, D. V. Dietary Poultry Fat and Gastrointestinal Transit Time of Feed and Fat Utilization in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 71, n. 8, p. 1357-1363, 1992.

HIDALGO, M. A. et al. Live Performance and Meat Yield Responses of Broilers to Progressive Concentrations of Dietary Energy Maintained at a Constant Metabolizable Energy-to-Crude Protein Ratio. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 2, p. 319-327, 2004.

HONDA, K. et al. Effects of Dietary Fat Levels on Nutrient Digestibility at Different Sites of Chicken Intestines. **The Journal of Poultry Science**, v. 46, n. 4, p. 291-295, 2009.

IQBAL, M. et al. Immunohistochemical evidence of cytochrome c oxidase subunit II involvement in pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers. **Poultry Science**, v. 81, n. 8, p. 1231-1235, 2002.

IQBAL, M. et al. Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 933-941, 2005.

IQBAL, M. et al. Low Feed Efficient Broilers Within a Single Genetic Line Exhibit Higher Oxidative Stress and Protein Expression in Breast Muscle with Lower Mitochondrial Complex Activity. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 474-484, 2004.

KIM, J. H. et al. Effect of dietary supplementation of crude glycerol or tallow on intestinal transit time and utilization of energy and nutrients in diets fed to broiler chickens. **Livestock Science**, v. 154, n. 1-3, p. 165-168, 2013.

LEENSTRA, F. R. Effect of age, sex, genotype and environment on fat deposition in broiler chickens—a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 42, n. 1, p. 12-25, 1986.

LEESON, S.; CASTON, L.; SUMMERS, J. D. Broiler response to diet energy. **Poultry Science**, v. 75, n. 4, p. 529-535, 1996.

LEESON, S.; SUMMERS, J. **Nutrition of the Chicken**. 4 ed. Guelph, Ontario, Canada: University Books, 2001. 601p.

LETERRIER, C. et al. Reducing growth rate of broiler chickens with a low energy diet does not improve cortical bone quality. **British Poultry Science**, v. 39, n. 1, p. 24-30, 1998.

LIU, L. et al. Nutrient sensing by the mitochondrial transcription machinery dictates oxidative phosphorylation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 2, p. 768-784, 2014.

MARTÍNEZ, V. et al. Effects of cholecystokinin and gastrin on gastroduodenal motility and coordination in chickens. **Life Sciences**, v. 52, n. 2, p. 191-198, 1993.

MATEOS, G. G.; SELL, J. L.; EASTWOOD, J. A. Rate of food passage (transit time) as influenced by level of supplemental fat. **Poultry Science**, v. 61, n. 1, p. 94-100, 1982.

MCDONALD, P. et al. **Animal Nutrition**. 7 ed. London, UK: Prentice Hall, 2010. 692p.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2 ed. Gainesville, FL, USA: Elsevier Science B. V., 2003. 639p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5 ed. New York, USA: W. H. Freeman, 2008. 1294p.

NRC. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9ed ed. Washington, DC: National Academy Press, 1994. 176p.

OJANO-DIRAIN, C. et al. Gene Expression in Breast Muscle and Duodenum from Low and High Feed Efficient Broilers. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 372-381, 2007.

ONYANGO, E. M. et al. Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. **Poultry Science**, v. 82, n. 11, p. 1787-91, 2003.

PLAVNIK, I. et al. The response of broiler chickens and turkey poults to dietary energy supplied either by fat or carbohydrates. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1000-1005, 1997.

PLUMSTEAD, P. W. et al. Effects of dietary metabolizable energy and protein on early growth responses of broilers to dietary lysine. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2639-2648, 2007.

RAMA RAO, S. V. et al. Requirement of calcium for commercial broilers and white leghorn layers at low dietary phosphorus levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, p. 199-208, 2003.

REECE, W. O. **Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals**. 4 ed. USA: Wiley-Blackwell, 2009. 592p.

RICHARDS, M. P.; PROSZKOWIEC-WEGLARZ, M. Mechanisms Regulating Feed Intake, Energy Expenditure, and Body Weight in Poultry. **Poultry Science**, v. 86, n. 7, p. 1478-1490, 2007.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 3 ed. Viçosa, MG, Brasil: Universidade Federal de Viçosa - DZO, 2011. 252p.

SALEH, E. et al. Effects of dietary nutrient density on performance and carcass quality of male broilers grown for further processing. **International Journal of Poultry Science** v. 3, n. 1, p. 1-10, 2004.

SAVORY, C. J.; DUKE, G. E.; BERTOY, R. W. Influence of intravenous injections of cholecystokinin on gastrointestinal motility in turkeys and domestic fowls. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 2, p. 179-189, 1981.

SILVA, J. H. V.; ALBINO, L. F. T.; NASCIMENTO, A. H. Níveis de energia e relações energia: proteína para frangos de corte de 22 a 42 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1791-1800, 2001.

SINDIRAÇÕES. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. **Boletim Informativo do Setor de Alimentação Animal – Dez/2015**. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2015/12/boletim_informativo_do_setor_de_alimentacao_animal_dez2015_online.pdf>. Acesso em 27 jan. 2016.

SKINNER, J. T.; WALDROUP, A. L.; WALDROUP, P. W. Effects of Dietary Nutrient Density on Performance and Carcass Quality of Broilers 42 to 49 Days of Age. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 1, n. 4, p. 367-372, 1992.

TOYOMIZU, M. et al. Dietary protein level alters oxidative phosphorylation in heart and liver mitochondria of chicks. **British Journal of Nutrition**, v. 68, n. 01, p. 89-99, 1992.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/data-products/international-baseline-data.aspx>>. Acesso em 27 de jan. 2016.

VENÄLÄINEN, E.; VALAJA, J.; JALAVA, T. Effects of dietary metabolisable energy, calcium and phosphorus on bone mineralisation, leg weakness and performance of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 47, n. 3, p. 301-310, 2006.

WANG, J.; PIERSON, R. N. Disparate Hydration of Adipose and Lean Tissue Require a New Model for Body Water Distribution in Man. **The Journal of Nutrition**, v. 106, n. 12, p. 1687-1693, 1976.

WANG, J. W. et al. Identification of differentially expressed genes induced by energy restriction using annealing control primer system from the liver and adipose tissues of broilers. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 972-978, 2012.

WILLIAMS, B. et al. Skeletal development in the meat-type chicken. **British Poultry Science**, v. 41, n. 2, p. 141-9, 2000.

Efeito de níveis energéticos e nutrientes dietéticos sobre o desempenho e expressão de genes da cadeia respiratória no fígado de frangos de corte

Resumo

Objetivou-se com o presente estudo, avaliar os efeitos de níveis energéticos e ajustes de nutrientes (lisina, cálcio e fósforo) sobre o desempenho, rendimento de carcaça e na expressão de genes relacionados com a cadeia transportadora de elétrons (CTE) no fígado de frangos de corte dos 22 aos 42 dias de idade. Um total de 432 frangos de corte, machos, Cobb 500 foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado em três tratamentos com oito repetições de dezoito aves por unidade experimental. O primeiro, tratamento controle (Ctrl), foi representado por uma ração a base de milho e farelo de soja, contendo energia metabolizável (EM) de 3025 kcal/kg. O segundo tratamento (Ctrl + EM) foi obtido com o aumento de 150 kcal/kg no valor de EM em relação a ração controle, mantendo os valores de lisina digestível, cálcio (Ca) e fósforo disponível (aP). No terceiro tratamento (EM + CN), foi aumentado o valor de EM (150 kcal/kg) em relação a ração controle e os nutrientes lisina digestível, Ca e aP foram ajustados proporcionalmente ao aumento energético. O desempenho e os rendimentos da carcaça das aves foram analisados. Além disso, foram analisadas as expressões dos genes *ND1* e *COX1*. Os tratamentos proporcionaram efeitos significativos sobre o desempenho, o que não foi observado para rendimento de carcaça. Verificou-se que o aumento na energia metabolizável da ração proporcionou maior eficiência alimentar em relação ao tratamento controle. Em comparação com o grupo controle, quando se aumentou a energia e corrigiu os nutrientes, observou-se melhora no ganho de peso. A expressão dos genes da CTE (*ND1* e *COX1*) não diferiram entre os tratamentos. Em conclusão, os resultados indicam que rações mais

energéticas e a correção dos nutrientes promovem melhora no desempenho de frangos de corte (22-42d), mas não alteram os rendimentos de carcaça e a expressão de genes da CTE.

Palavras-chave: aminoácidos, minerais, mitocôndria, expressão gênica

Introdução

O aminoácido lisina e os minerais cálcio e fósforo são, entre outros, nutrientes que precisam estar em quantidades adequadas na ração para dar suporte ao crescimento das aves. Assim, é importante ajustar proporcionalmente estes nutrientes quando se aumenta o nível energético das rações, evitando a deposição excessiva de gordura e mantendo a taxa de crescimento (Leeson e Summers, 2001).

Tem sido demonstrado o efeito benéfico de rações mais energéticas e dos nutrientes lisina, cálcio e fósforo sobre as características de desempenho e carcaça das aves (Hidalgo *et al.*, 2004; Venäläinen *et al.*, 2006; Dozier *et al.*, 2011). Além disso, busca-se através de pesquisas mais conhecimento acerca dos efeitos da relação energia:nutriente sobre mecanismos moleculares da produção energética mitocondrial. Em frangos de corte a relação proteína:energia está associada ao funcionamento da mitocôndria (Toyomizu *et al.*, 1992) e a disponibilidade de energia dietética está relacionada com a expressão de genes mitocondriais (Wang *et al.*, 2012). Além disso, foi visto que existe relação entre o desempenho e expressão de genes mitocondriais em frangos de corte (Bottje *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2004; Ojano-Dirain *et al.*, 2007). Sendo assim, melhoras na eficiência alimentar, estimuladas pelos níveis energéticos e concentrações de aminoácidos e minerais, podem estar relacionadas com a expressão de genes envolvidos com a cadeia transportadora de elétrons (CTE).

Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos de níveis energéticos e nutrientes dietéticos (lisina, cálcio e fósforo) sobre a expressão de mRNA *COX1* e *ND1* da CTE, bem como a relação com o desempenho de frangos de corte (22 – 42d).

Material e Métodos

Todos os procedimentos aplicados neste experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa/Brasil sob o protocolo nº 002/2015.

Delineamento experimental e animais

Para a realização deste experimento, foram utilizados 432 frangos de corte, machos, da linhagem comercial Cobb 500 de 22 dias de idade. Até os 21 dias de idade, as aves foram criadas em galpão de alvenaria com piso de concreto coberto por maralhaveira, onde estavam disponíveis bebedouros e comedouros para o fornecimento de água e ração *ad libitum*. A ração utilizada até os 21 dias de idade foi formulada a base de milho e farelo de soja, com 220 g/kg de proteína bruta, energia metabolizável (EM) de 2980 kcal/kg, 11,74 g/kg de lisina digestível, 8,95 g/kg de Cálcio (Ca) e 4,38 g/kg de fósforo digestível (aP). Para a condução do experimento, aos 22 dias de idade, as aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos, formados por oito repetições de dezoito aves por unidade experimental. As aves apresentaram o peso médio inicial de $856 \pm 6,0$ gramas. A unidade experimental foi constituída por um box de 2 m² onde estavam disponíveis bebedouros e comedouro.

O primeiro tratamento, controle (Ctrl), consistiu numa ração formulada a base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações sugeridas por Rostagno *et al.* (2011), para frangos de corte no período de 22 a 42 dias de idade (Tabela 1). A ração controle possuiu por kg: 3025 kcal de EM, 10,50 g de lisina digestível, 6,85 g de Ca e 3,20 g de aP. O segundo tratamento (Ctrl + EM), foi obtido com o aumento de EM (150 kcal/kg) em relação a ração controle, mantendo os valores de lisina digestível, Ca e aP. No terceiro tratamento (EM + CN), foi aumentado o valor de EM (150 kcal/kg) em

relação a ração controle e os nutrientes lisina digestível, Ca e aP foram ajustados proporcionalmente ao aumento energético. As relações entre a lisina e os aminoácidos metionina + cisteína, treonina e valina foram mantidas entre os tratamentos.

As aves foram mantidas em um período de luz contínuo (24 h/dia), com alimentação e água *ad libitum* durante o período experimental. Neste período, registrou-se a temperatura média de 24,7 °C.

Desempenho e rendimentos de carcaça

As aves e as rações fornecidas foram pesadas no início e no final do experimento para determinar o consumo de ração, ganho de peso e a eficiência alimentar. A mortalidade foi verificada diariamente a fim de ajustar os dados de desempenho. Aos 42 dias de idade, oito aves por tratamento foram selecionadas em função do peso médio. Após jejum de 8 horas, as aves foram insensibilizadas por eletronarcose e abatidas por corte da veia jugular e artérias carótidas. As aves foram processadas para determinar os rendimentos de carcaça, peito, gordura abdominal e fígado em relação ao peso da ave em jejum.

Extração do RNA e síntese do DNA complementar

Para avaliação de expressão gênica, quatro aves de cada tratamento na idade de 42 dias, selecionadas em função do peso médio e abatidas por deslocamento cervical. Imediatamente após o abate, uma amostra do fígado foi coletada em nitrogênio líquido para conservar a molécula RNA do tecido no momento da coleta. As amostras ficaram armazenadas a - 70°C até a extração de RNA.

O RNA total foi extraído utilizando o *NucleoSpin RNA kit* (Macherey-Nagel, Düren, NRW, DEU), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração do

RNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo 10 % e visualizado sob luz ultravioleta. O RNA total foi armazenado a - 70 °C até o momento de uso. A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir das amostras do fígado foi feita com o *Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de cDNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Reação de cadeia polimerase em tempo real

As reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas por meio de detecção com *SYBR GREEN PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Os primers utilizados para as reações de amplificação dos genes (ND1 – NADH desidrogenase subunidade I; COX I – citocromo c oxidase; Beta-actina (ACTB) e EEF1 - Fator de alongação da tradução eucariótica 1) foram desenhados no programa *PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/SciTools/Applications/primerQuest>) a partir de sequências de nucleotídeos de mRNA de *Gallus gallus* do banco de dados *Ensembl* (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus) e *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Utilizou-se o EEF1 como gene de referência por apresentar maior eficiência e menor variação que o ACTB (dados não mostrados). Todos os primers usados nesse trabalho foram específicos e estão descritos na Tabela 2.

A eficiência de cada reação foi avaliada através da escolha da melhor relação de concentração dos primer e cDNA nas reações. A eficiência do PCR foi calculada usando a seguinte fórmula: $E = 3^{(-1/\text{inclinação})}$, onde considera a inclinação observada na regressão linear estabelecida entre os valores de Ct (Cycle threshold) e log de cDNA para cada concentração de primer.

A eficiência de amplificação para todos os genes variou de 0,90 a 1,10% (dados não mostrados). Todas as reações foram feitas em duplicatas e o coeficiente de variação dos valores de Ct a partir das replicatas foram menores que 5 %, indicando a validade dos dados (dados não mostrados).

Análises estatística dos resultados

Os dados de desempenho e composição de carcaça foram analisados utilizando o procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5 % de significância. Os dados de expressão gênica, foram analisados estatisticamente usando a macro %QPCR_MIXED SAS® (https://msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html) desenvolvida pelos comandos no SAS PROC MIXED, a qual considera os efeitos aleatórios independentes para os genes alvos e de referência em cada replicata biológica (Steibel et al., 2009). Os dados foram expressos em valores de fold change, estimados com o método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Resultados

Desempenho e rendimentos da carcaça

Observou-se que o aumento de 150 kcal/kg na ração, com ou sem a correção dos nutrientes, promoveu melhora significativa na eficiência alimentar ($P < 0,01$) em relação ao tratamento controle. No entanto, o ganho de peso foi aumentado significativamente ($P < 0,05$) apenas quando os nutrientes foram corrigidos na ração. O consumo de ração e as variáveis de rendimento da carcaça das aves não foram afetadas significativamente ($P > 0,05$) pelos tratamentos dietéticos (Tabela 3).

Expressão Gênica

Os resultados da análise de PCR quantitativa no fígado de frangos de corte alimentados com diferentes dietas dos 22 aos 42 dias de idade não demonstraram diferenças significativas ($P < 0,05$) na expressão de mRNA *COX1* e *ND1* entre os tratamentos dietéticos (Figura 1).

Discussão

Neste estudo, rações com aumento nos níveis de energia e correção de nutrientes proporcionaram melhoras no desempenho das aves, corroborando com outros trabalhos (Hidalgo *et al.*, 2004; Saleh *et al.*, 2004; Dozier *et al.*, 2011). A ausência de variação no consumo de ração é reforçada por Richards e Proszkowiec-Weglarz (2007) e Plumstead *et al.* (2007), os quais afirmaram que os frangos de corte não regulam a ingestão de alimento em função do balanço energético da ração.

O aumento no ganho de peso está mais associado com a deposição de proteína (Boekholt *et al.*, 1994), pois para cada grama de proteína depositada ocorre retenção de três gramas de água (Leenstra, 1986), enquanto o tecido adiposo contém cerca de 20 % de água (Wang e Pierson, 1976). O processo de deposição proteica demanda um aporte energético na ração, sendo necessário 0,7 kcal para cada grama de proteína depositada (Buttery and Boorman, 1976). Por sua vez, o tecido proteico é influenciado pelo balanço de aminoácidos dietéticos, sendo a lisina o principal deles (Macleod, 1997). Dessa forma, o aumento em 4,96 % de lisina digestível mantendo o perfil aminoacídico, além do mesmo acréscimo em Ca, aP e EM na ração pode justificar o aumento no ganho de peso das aves alimentadas com a ração EM + CN em relação ao tratamento controle.

Para sustentar o ganho de peso proporcionado pela ração, faz-se necessário outros nutrientes, como o Ca e o P que são importantes para o metabolismo e

manutenção da estrutura óssea das aves (Adedokun e Adeola, 2013). Venäläinen *et al.* (2006) observaram que frangos de corte, quando receberam a ração mais energética (EM = 2870 kcal/kg) em relação ao grupo controle (EM = 2630 kcal/kg), apresentaram tíbias maiores, mais largas e pesadas, dando suporte ao ganho de peso. Verificou-se ainda que ao aumentar os níveis de Ca e P nas rações, houve incremento nas concentrações na tíbia.

O incremento energético em rações para aves, através da adição de óleos como foi realizada neste trabalho, pode contribuir para melhorar a digestibilidade dos nutrientes (Golian e Maurice, 1992; Leeson e Summers, 2001; Kim *et al.*, 2013), já que a presença de ácidos graxos no trato gastrointestinal das aves aumenta o tempo de retenção do alimento (Mateos *et al.*, 1982; Honda *et al.*, 2009), podendo favorecer maiores atividades das enzimas digestivas e consequentemente o aumento na digestibilidade dos nutrientes (Danicke *et al.*, 1999). Reforça-se a importância do uso de óleo de soja em rações para aves por favorecer a redução do incremento calórico e consequentemente o aumento da energia líquida para manutenção e produção (Leeson e Summers, 2001). Estas observações podem ter sido a razão da melhora na eficiência alimentar das aves alimentadas com as rações com maior teor energético (3175 kcal/kg).

O aumento energético e os ajustes nutricionais não foram suficientes para promover diferenças nas variáveis de carcaça. Os resultados estão similares com os resultados de outros trabalhos (Hidalgo *et al.*, 2004; Kamran *et al.*, 2008), porém, diferentes dos observados por Leeson *et al.* (1996) e Zaman *et al.* (2008), que observaram aumento na gordura abdominal de frangos de corte com o aumento energético na ração. Leeson *et al.* (1996) avaliaram quatro rações com diferentes teores energéticos (2700, 2900, 3100 e 3300 kcal/kg) e verificaram aumento de

gordura abdominal que pode ser reflexo das diferenças entre as energias dietéticas, do período de fornecimento (1-49 d) e da falta de ajustes dos nutrientes em proporção aos níveis energéticos das rações. No entanto, Hidalgo *et al.* (2004) forneceram rações para frangos de corte com diferentes níveis energéticos, mantendo as relações para os aminoácidos e não observaram diferenças para porcentagem de deposição de gordura abdominal entre o menor e o maior nível energético, 3085 e 3305 kcal/kg, respectivamente.

No presente trabalho, apesar de as aves apresentarem diferentes respostas para desempenho, não foram observadas mudanças na expressão dos genes da CTE avaliados (*COX 1* e *ND1*). Os genes *COX1* e *ND1* tiveram expressões maiores nas aves alimentadas com as rações Ctrl + EM e EM + CN em relação a Ctrl, mas não foi diferiu estatisticamente. Provavelmente, as alterações no nível energético da ração e nos níveis dos nutrientes lisina digestível, Ca e aP não foram suficientes para promover diferenças.

As proteínas NADH desidrogenase e citocromo c oxidase são moléculas que fazem parte da cadeia respiratória mitocondrial. As NADH desidrogenase fazem parte do complexo I, sendo responsável pela transferência de elétrons e bombeamento de prótons na membrana mitocondrial interna a partir de substrato ligados ao NADH. As proteínas COX fazem parte do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons e são responsáveis pela transferência de elétrons e bombeamento de prótons, além de transferir elétrons para o oxigênio o qual liga-se aos prótons formando água. Dessa forma, alterações nas moléculas do complexo respiratório podem interferir no funcionamento da cadeia respiratória e consequentemente na eficiência energética da mitocôndria.

Em frangos de corte (14 - 35d), Toyomizu *et al.* (1992) verificaram que o aumento da proteína como constituinte da EM (7, 25, 43 e 61 %) da ração reduziu a eficiência de síntese de ATP, mas não teve efeito na taxa de respiração ativa nas mitocôndrias hepáticas. Por sua vez, Wang *et al.* (2012) avaliaram o efeito da restrição energética através da limitação no consumo de ração para frangas de corte, dos 18 aos 49 dias de idade e nas aves que sofreram essa restrição, observou-se redução na expressão de mRNA *ND1* no fígado.

A produção energética celular é uma rede complexa, com numerosas etapas capazes de interferir no funcionamento mitocondrial. Assim, pode-se considerar que os tratamentos dietéticos podem ter afetado outros pontos que foram capazes de alterar a eficiências das aves, como a ação da ATP sintase no complexo V ou mesmo a ação das translocases presentes na membrana mitocondrial interna que são responsáveis pela passagem de moléculas como o ATP e ADP, etc.

Em conclusão, os resultados indicam que rações mais energéticas (3175 kcal/kg) e o ajuste proporcional dos nutrientes como lisina digestível, cálcio e fósforo disponível não alteram a expressão do *COX1* e *ND1* no fígado, mas promovem melhora no desempenho de frangos de corte (22 - 42d).

Agradecimentos

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC) pelo apoio financeiro.

Referências

- Adedokun SA and Adeola O 2013. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. The Journal of Applied Poultry Research 22, 600-608.
- Boekholt HA, van der Grinten P, Schreurs VV, Los MJ and Leffering CP 1994. Effect of dietary energy restriction on retention of protein, fat and energy in broiler chickens. British Poultry Science 35, 603-614.

- Bottje WG, Iqbal M, Tang ZX, Cawthon D, Okimoto R, Wing T and Cooper M 2002. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Science* 81, 546-555.
- Danicke S, Vahjen W, Simon O and Jeroch H 1999. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium. on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poultry Science* 78, 1292-1299.
- Dozier WA, Gehring CK, Corzo A and Olanrewaju HA 2011. Apparent metabolizable energy needs of male and female broilers from 36 to 47 days of age. *Poultry Science* 90, 804-814.
- Golian A and Maurice DV 1992. Dietary Poultry Fat and Gastrointestinal Transit Time of Feed and Fat Utilization in Broiler Chickens. *Poultry Science* 71, 1357-1363.
- Hidalgo MA, Dozier WA, Davis AJ and Gordon RW 2004. Live Performance and Meat Yield Responses of Broilers to Progressive Concentrations of Dietary Energy Maintained at a Constant Metabolizable Energy-to-Crude Protein Ratio. *The Journal of Applied Poultry Research* 13, 319-327.
- Honda K, Kamisoyama H, Isshiki Y and Hasegawa S 2009. Effects of Dietary Fat Levels on Nutrient Digestibility at Different Sites of Chicken Intestines. *The Journal of Poultry Science* 46, 291-295.
- Iqbal M, Pumford NR, Tang ZX, Lassiter K, Wing T, Cooper M and Bottje W 2004. Low Feed Efficient Broilers Within a Single Genetic Line Exhibit Higher Oxidative Stress and Protein Expression in Breast Muscle with Lower Mitochondrial Complex Activity. *Poultry Science* 83, 474-484.
- Kamran Z, Sarwar M, Nisa M, Nadeem MA, Mahmood S, Babar ME and Ahmed S 2008. Effect of Low-Protein Diets Having Constant Energy-to-Protein Ratio on Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens from One to Thirty-Five Days of Age. *Poultry Science* 87, 468-474.
- Kim JH, Seo S, Kim CH, Kim JW, Lee BB, Lee GI, Shin HS, Kim MC and Kil DY 2013. Effect of dietary supplementation of crude glycerol or tallow on intestinal transit time and utilization of energy and nutrients in diets fed to broiler chickens. *Livestock science* 154, 165-168.
- Leenstra FR 1986. Effect of age, sex, genotype and environment on fat deposition in broiler chickens—a review. *World's Poultry Science Journal* 42, 12-25.
- Leeson S and Summers J 2001. *Nutrition of the Chicken*. University Books, Guelph, Ontario, Canada.
- Leeson S, Caston L and Summers JD 1996. Broiler response to diet energy. *Poultry Science* 75, 529-535.
- Livak KJ and Schmittgen TD 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Macleod MG 1997. Effects of amino acid balance and energy: Protein ratio on energy and nitrogen metabolism in male broiler chickens. *British Poultry Science* 38, 405-411.
- Mateos GG, Sell JL and Eastwood JA 1982. Rate of food passage (transit time) as influenced by level of supplemental fat. *Poultry Science* 61, 94-100.
- Ojano-Dirain C, Toyomizu M, Wing T, Cooper M and Bottje WG 2007. Gene Expression in Breast Muscle and Duodenum from Low and High Feed Efficient Broilers. *Poultry Science* 86, 372-381.
- Plumstead PW, Romero-Sanchez H, Paton ND, Spears JW and Brake J 2007. Effects of dietary metabolizable energy and protein on early growth responses of broilers to dietary lysine. *Poultry Science* 86, 2639-2648.
- Richards MP and Proszkowiec-Weglarz M 2007. Mechanisms Regulating Feed Intake, Energy Expenditure, and Body Weight in Poultry. *Poultry Science* 86, 1478-1490.
- Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira Rd, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto S and Euclides RF 2011. *Tabelas brasileiras para aves e suínos*. Universidade Federal de Viçosa - DZO, Viçosa, MG, Brasil.

- Saleh E, Watkins S, Waldroup A and Waldroup P 2004. Effects of dietary nutrient density on performance and carcass quality of male broilers grown for further processing. *International Journal of Poultry Science* 3, 1-10.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM and Rosa GJM 2009. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146-152.
- Toyomizu M, Kirihaara D, Tanaka M, Hayashi K and Tomita Y 1992. Dietary protein level alters oxidative phosphorylation in heart and liver mitochondria of chicks. *British Journal of Nutrition* 68, 89-99.
- Venäläinen E, Valaja J and Jalava T 2006. Effects of dietary metabolisable energy, calcium and phosphorus on bone mineralisation, leg weakness and performance of broiler chickens. *British Poultry Science* 47, 301-310.
- Wang J and Pierson RN 1976. Disparate Hydration of Adipose and Lean Tissue Require a New Model for Body Water Distribution in Man. *The Journal of nutrition* 106, 1687-1693.
- Wang JW, Chen W, Kang XT, Huang YQ, Tian YD and Wang YB 2012. Identification of differentially expressed genes induced by energy restriction using annealing control primer system from the liver and adipose tissues of broilers. *Poultry Science* 91, 972-978.
- Zaman QU, Mushtaq T, Nawaz H, Mirza MA, Mahmood S, Ahmad T, Babar ME and Mushtaq MMH 2008. Effect of varying dietary energy and protein on broiler performance in hot climate. *Animal Feed Science and Technology* 146, 302-312.

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional das rações experimentais

Ingrediente (g/kg)	Ctrl	Ctrl + EM	EM + CN
Milho (7,88%)	577,64	577,64	577,64
Farelo de Soja (45%)	301,31	301,31	301,31
Glúten de Milho (60%)	20,00	20,00	20,00
Óleo de Soja	31,04	48,10	48,10
Inerte ¹	30,00	12,94	11,90
Fosfato Bicálcico	11,78	11,78	12,65
Calcário	8,12	8,12	8,45
Amido	8,00	8,00	6,24
Sal	4,00	4,00	4,00
L-Lisina HCl (78 %)	1,89	1,89	2,56
DL-Metionina (99 %)	2,16	2,16	2,53
L-Treonina (98 %)	0,16	0,16	0,50
L-Valina (98 %)	-	-	0,23
Suplemento Vitamínico ²	1,10	1,10	1,10
Suplemento Mineral ³	1,10	1,10	1,10
Cloreto de Colina (60 %)	1,00	1,00	1,00
Coxistac ⁴	0,55	0,55	0,55
BHT ⁵	0,10	0,10	0,10
Avilamicina ⁶	0,05	0,05	0,05
Composição Química			
Energia Metabolizável, kcal/kg	3025	3175	3175
Proteína Bruta, g/kg	197,00	197,00	198,30
Gordura Bruta, g/kg	59,28	76,28	76,28
Lisina digestível, g/kg	10,50	10,50	11,02
Cálcio, g/kg	6,85	6,85	7,19
Fósforo disponível, g/kg	3,20	3,20	3,36
Metionina digestível, g/kg	4,93	4,93	5,29
Metionina + Cisteína digestível, g/kg	7,67	7,67	8,04
Treonina digestível, g/kg	6,83	6,83	7,16
Triptofano digestível, g/kg	2,09	2,09	2,09
Arginina digestível, g/kg	11,89	11,89	11,89
Isoleucina digestível, g/kg	7,65	7,65	7,65
Leucina digestível, g/kg	16,88	16,88	16,88
Valina digestível, g/kg	8,38	8,38	8,60
Histidina digestível, g/kg	4,83	4,83	4,83
Fenilalanina digestível, g/kg	9,28	9,28	9,28
Glicina + Serina digestível, g/kg	16,27	16,27	16,27
Potássio, g/kg	7,22	7,22	7,22
Sódio, g/kg	1,77	1,77	1,77

¹ - Areia lavada

² - Níveis de garantia por quilo do produto: vitamina A - 10.000.000 UI; vitamina D3 - 2.000.000 UI; Vitamina E - 30.000 UI; Vitamina B1 - 2,0g; vitamina B6 - 4,0 g; Ácido Pantotênico - 12,0 g; Biotina - 0,10 g; Vitamina K3 - 3,0 g; Ácido fólico - 1,0 g; Ácido nicotínico- 50,0 g; Vitamina B12 - 15.000 mcg; Selênio - 0,25 g; e Veículo q. s. p. - 1.000g.

³ - Níveis de garantia por quilo de produto: Manganês 16,0 g; Ferro - 100,0 g; Zinco – 100,0 g; Cobre - 20,0 g; Cobalto - 2,0 g; Iodo - 2,0 g; e Veículo q.s.p. - 1.000g.

⁴ - Anticoccidiano Salinomicina 120 g/kg.

⁵ - Antioxidante

⁶ - Promotor de crescimento

1 **Tabela 2.** Pares de primer utilizados para analisar a expressão gênica

Nome do gene	Símbolo do Gene	Identificação	Sequência do Primer	Temperatura de Anelamento (°C)	Amplicon (bp)
NADH desidrogenase subunidade I	ND1	ENSGALT00000029102	5' - AGAAGGAGAGTCAGAGCTAGTC 3' - CTTGGGTTTCAGGAATAGGACG	62	135
Citocromo c oxidase subunidade I	COX I	ENSGALT00000029093	5' - GTCCTCATTACTGCCATCCTAC 3' - GGTGTTGGTATAGGATTGGGTC	62	139
Beta-actina	ACTB	ENSGALG00000009621	5' - ACCCCAAAGCCAACAGA 3' - CCAGAGTCCATCACAATACC	60	136
Fator de alongação da tradução eucariótica – 1	EEF-1	NM_204157.2	5' - GCCCGAAGTTCCTGAAATCT 3' - AACGACCCAGAGGAGGATAA	60	95

2

Tabela 3. *Efeitos dos níveis energéticos e nutrientes dietéticos no desempenho e rendimentos de carcaça de frangos de corte machos (22-42 d)*

	Tratamentos ¹			EPM ²	Valor-P
	Ctrl	Ctrl + EM	EM + CN		
GP (kg)	1,927 ^b	1,967 ^{ab}	2,033 ^a	0,0767	0,0377
CR (kg)	3,328 ^a	3,313 ^a	3,344 ^a	0,0921	0,8066
EA (kg/kg)	0,579 ^b	0,594 ^a	0,608 ^a	0,0142	0,0017
Carcaça (%)	85,89	86,23	84,81	1,488	0,1607
Peito (%)	30,95	29,73	30,22	1,871	0,4417
GA (%)	1,10	1,35	1,34	0,523	0,5736
Fígado (%)	1,58	1,76	1,63	0,190	0,1928

GP – Ganho de Peso; CR - Consumo de Ração; EA – Eficiência Alimentar; GA – Gordura Abdominal

¹ Controle = 3025 kcal/kg; Controle + Energia = 3175 kcal/kg sem correção de nutrientes; Energia + Correção = 3175 kcal/kg com correção de nutrientes.

²EPM – Erro padrão da média agrupado;

^{a-b} Médias dentro de uma mesma linha seguidas de diferentes letras sobrescritas diferem significativamente a $P < 0.05$ pelo teste Tukey.

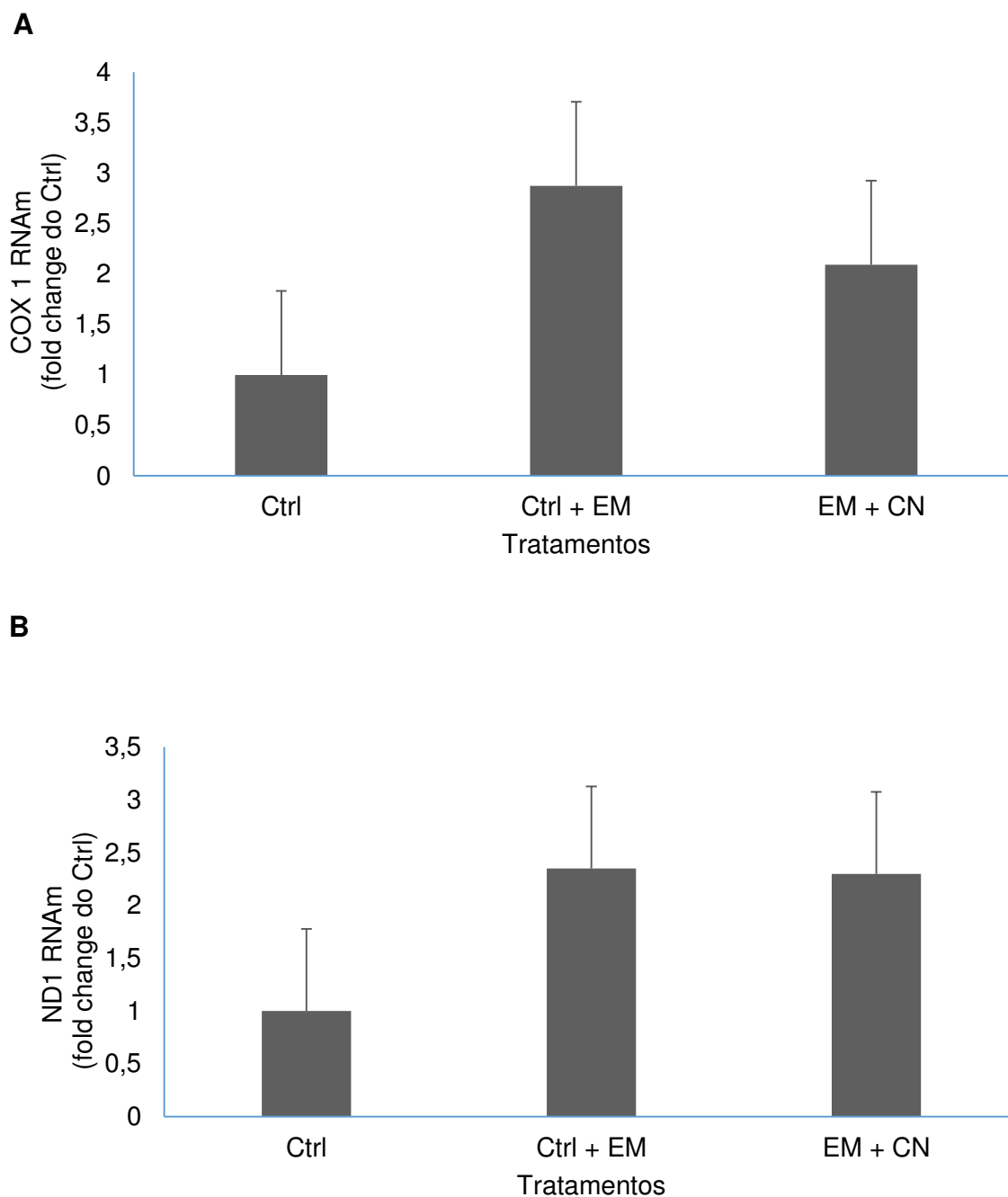


Figure 1 Valores de expressão relativa (fold change) de RNAm de COX1 (A) e ND1 (B) no fígado de frangos de corte alimentados com diferentes rações dos 22 aos 42 dias de idade. Ctrl = 3025 kcal/kg; Ctrl + EM = 3175 kcal/kg sem correção de nutrientes; EM + CN = 3175 kcal/kg com correção de nutrientes. Valores são médias com erro padrão.