

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

LEUCINA E VALINA EM DIETAS DE BAIXA PROTEÍNA
PARA FRANGOS DE CORTE

Autor: Iván Camilo Ospina Rojas
Orientador: Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio - 2015

LEUCINA E VALINA EM DIETAS DE BAIXA PROTEÍNA PARA FRANGOS DE CORTE

Autor: Iván Camilo Ospina Rojas
Orientador: Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio – 2015

*“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria; O que você sente, você atrai;
O que você acredita. Torna-se Realidade”*

(Provérbio budista)

A minha mãe,

Gloria Rojas Guzmán

A quem amo e admiro. Pelo amor incondicional, incentivo, apoio nas horas difíceis e orações.

Ao meu Pai,

Gabriel Arcangel Ospina Quintero (in memoriam)

A quem amo, admiro e devo boa parte de minha formação pessoal e profissional. O maior homem que já conheci, e o melhor pai que alguém pode ter. Por exemplo de honestidade, integridade e dignidade.

A minha Namorada,

Tatiana Garcia Diaz

Pelo apoio incondicional em todo momento, conselhos, amizade, amor e dedicação, com você ao meu lado qualquer obstáculo torna-se fácil de superar e qualquer objetivo passível de ser alcançado.

Com todo meu amor muito obrigado.

DEDICO..

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, minha gratidão por tudo quanto tenho recebido da sua infinita bondade e, o que terei de receber, por ter me conduzido nesta jornada e me dado forças para vencer as dificuldades e obstáculos.

Aos meus irmãos, Daniela, Juan e Fabian, obrigado pelo incentivo, apoio e amizade.

A Prof^ª Dr^ª Alice Eiko Murakami, pela oportunidade da realização do mestrado e doutorado, confiança, dedicada orientação, incentivo, ensinamentos, pela amizade e conselhos sinceros. Obrigado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UEM, em especial, Paulo Cesar Pozza, Carlos Antonio Lopes de Oliveira, Ricardo Souza Vasconcellos e Tatiana Carlesso dos Santos, pelos ensinamentos e fundamental contribuição na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho e, disponibilizarem ensino gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Estudantes de Convênio/Pós Graduação (PEC/PG) da CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos e colegas, Cinthia Eyng, Cristiane Duarte, Karla Picoli, Elis Regina, Ana Flávia, Angélica Munhoz, Bianca Mascarin, Camila Blasques, Marília Figueiredo, Leonardo Zanetti, Mayra Diaz, Caio de Souza, Humberto Lipori, Alisson Figueiredo, Mariane Terezan, Ester Romero, pela amizade, apoio e companheirismo no decorrer dos experimentos.

Ao Denílson dos Santos Vicentin, secretário do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, sempre prestativo, obrigado pela ajuda, paciência e amizade.

Aos todos os funcionários da FEI (Fazenda Experimental Iguatemi – UEM), em especial a Toninho Silverio Sobrinho, pela constante ajuda nos trabalhos a campo.

Aos funcionários do LANA (Laboratório de Nutrição Animal - UEM), Cleuza Volpato, Creuza Azevedo e Augusto, pelo auxílio na realização das análises.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

IVÁN CAMILO OSPINA ROJAS, filho de Gabriel Arcangel Ospina Quintero e Gloria Rojas Guzmán, nasceu em Ibagué-Tolima (Colômbia), no dia 03 de agosto de 1987.

Curso o ensino Médio no Colégio Franciscano Jimenez de Cisneros — Ibagué-Tolima (Colômbia), concluindo-o no ano de 2004.

Em Fevereiro de 2005, iniciou no curso de Graduação em Veterinária e Zootecnia na Universidad del Tolima (Colômbia), concluindo-o no ano de 2010.

Em março de 2010, iniciou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção e Nutrição Animal, na Universidade Estadual de Maringá e no dia 13 de março de 2012 submeteu-se a banca para defesa da Dissertação.

No dia 29 de maio de 2015, submeteu-se a banca para defesa da Tese.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
I - INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	2
1.1.1 Antagonismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	4
1.2 Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre as fibras musculares.....	8
1.3 Aminoácidos de cadeia ramificada no metabolismo ósseo.....	9
1.4 Exigências dos aminoácidos leucina e valina nos frangos de corte.....	10
1.5 Papel da leucina na estimulação da síntese proteica celular.....	12
REFERÊNCIAS.....	15
II – OBJETIVOS GERAIS.....	21
III – Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 1-21 dias de idade.....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
IV - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 21-42 dias de idade.....	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO	44

MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	60
V - Expressão dos genes envolvidos na tradução do RNAm em proteína no músculo <i>pectoralis major</i> e parâmetros ósseos de frangos de corte suplementados com leucina e valina	63
RESUMO.....	63
ABSTRACT.....	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS	84
VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4E-BP1**: proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E
 β -OHB: β -hidroxibutirato
BCAA: Branched Chain Amino Acids - aminoácidos de cadeia ramificada
BCAAT: aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
BCKD: complexo desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada
BCKD quinase: desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada quinase
BCKD fosfatase: desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada fosfatase
eEF2: fator eucariótico de alongamento 2
eIF4E•4EBP1: complexo inibidor do fator de iniciação eucariótico 4G
GABA: ácido gama-aminobutírico
GAPDH: proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GH: hormônio do crescimento
HMB: β -hidroxi- β -metilbutirato
IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
KIC: α -cetoisocaproato
KIV: α -cetoisovalerato
K_m: constante de Michaelis
KMV: α -ceto- β -metilvalerato
mTOR: mechanistic Target of Rapamycin - alvo mecanístico de rapamicina
RNA: ácido ribonucleico
RNA_m: RNA mensageiro
S6K1: proteína ribossomal S6 quinase 1
TCA: ácido tricarbóxico
TG: triglicerídeos
PB: proteína bruta
POMC: pró-opiomelanocortina
PT: proteínas totais
qRT-PCR: reação da transcriptase reversa quantitativa em tempo real

LISTA DE TABELAS

	Página
III - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 1-21 dias de idade.....	22
Tabela 1. Composição percentual e calculada da dieta basal (1 – 21 dias).....	27
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis durante a fase de 1-21 dias de idade.....	30
Tabela 3. Níveis séricos de triglicerídeos (TG), β -hidroxibutirato (β -OHB), amônia, ácido úrico, albumina, proteínas totais (PT) e glicose de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 dias de idade.....	35
Tabela 4. Emissão de amônia, umidade e teor de nitrogênio da cama de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 dias de idade.....	37
IV - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 21-42 dias de idade.....	42
Tabela 1. Composição percentual e calculada da dieta basal (21 – 42 dias).....	47
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível durante a fase de 21-42 dias de idade.....	51
Tabela 3. Níveis séricos de triglicerídeos (TG), β -hidroxibutirato (β -OHB), amônia, ácido úrico, glicose, albumina e proteínas totais (PT) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível aos 42 dias de idade.....	55

Tabela 4. Emissão de amônia, umidade e teor de nitrogênio da cama de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível aos 42 dias de idade57

Tabela 5. Rendimento de carcaça, cortes e gordura abdominal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível aos 42 dias de idade.....58

V - Expressão dos genes envolvidos na tradução do RNAm em proteína no músculo *pectoralis major* e parâmetros ósseos de frangos de corte suplementados com leucina e valina62

Tabela 1. Composição percentual e calculada da dieta basal dos experimentos I, II (1 – 21 dias) e II (21-42 dias).....67

Tabela 2. . Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para frangos (S:sense; A: Antisense).....69

Tabela 3. Expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 e eEF2 no músculo *pectoralis major* de frangos de corte suplementados com leucina (experimento I).....74

Tabela 4. Concentrações de cálcio, fósforo e cinza na tíbia desengordurada de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 dias (experimento II) e 42 dias de idade (experimento III).....77

Tabela 5. Diâmetro, índice de Seedor e resistência óssea da tíbia de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 (experimento II) e 42 dias de idade (experimento III).....78

Tabela 6. Áreas da placa de crescimento (A1), da zona de cartilagem hipertrófica (A2) e total da epífise tibial (A3) e diâmetro da fibra muscular do músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com leucina e valina aos 21 (experimento II) e 42 dias de idade (experimento III).....81

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
I - INTRODUÇÃO	1
Figura 1. Vias catabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada	3
Figura 2. Conteúdo de leucina, valina e isoleucina digestível em alguns ingredientes na dieta de frangos de corte	5
Figura 3. Mecanismo de ação da leucina e insulina na tradução do RNAm no citoplasma das células eucarióticas	13
III - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 1-21 dias de idade	22
Figura 1. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre o consumo de ração de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 1 - 21 dias de idade.....	31
Figura 2. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre a conversão alimentar de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 1 - 21 dias de idade.....	33
IV - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 21-42 dias de idade.....	42
Figura 1. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre o consumo de ração de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 21 - 42 dias de idade...52	52

Figura 2. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre o ganho de peso de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 21 - 42 dias de idade.....53

V - Expressão dos genes envolvidos na tradução do RNAm em proteína no músculo *pectoralis major* e parâmetros ósseos de frangos de corte suplementados com leucina e valina.....62

Figura 1 - Corte histológico da epífise da tíbia de um frango de corte aos 21 dias de idade sem discondroplasia (osso um) e com a lesão (osso dois).....71

Figura 2. Expressão de RNAm do mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 e eEF2 no músculo *pectoralis major* de frangos de corte suplementados com leucina (experimento I).....75

Figura 3. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre a resistência óssea da tíbia de frangos de corte na fase de 1 - 21 dias de idade.....79

RESUMO

Cinco experimentos foram realizados com o objetivo estudar as exigências e interações entre a leucina e valina digestível em dietas com baixa proteína e, seus efeitos no desempenho, parâmetros séricos e ósseos, composição da cama, expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 e eEF2, e o diâmetro da fibra muscular do músculo *pectoralis major* de frangos de corte. Nos experimentos I (1-21 dias), II (21-42 dias), IV (1-21 dias) e V (21-42 dias), foram utilizados 1.500 frangos de corte machos, da linhagem Cobb–Vantress®, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5, composto de cinco níveis de leucina e cinco níveis de valina digestíveis, com três repetições de 20 aves por unidade experimental. Os níveis de leucina e valina digestíveis utilizados na fase inicial variaram de 1,00 a 1,96% e de 0,60 a 1,20%, enquanto que na fase de crescimento, foram de 1,00 a 1,80% e de 0,52 a 1,12%, respectivamente. No experimento III (1-21 dias), foram utilizados 540 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress®, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3, totalizando 9 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de três níveis de leucina digestível (1,00; 1,48 e 1,96%) e três níveis de valina digestível (0,60; 0,90 e 1,20%). No experimento I (fase inicial), aos 21 dias foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina para o consumo de ração e conversão alimentar. Houve efeito quadrático ($P < 0,01$) dos níveis de leucina e valina digestível para o ganho de peso, com ponto de máxima nos níveis de 1,28 e 0,92%, respectivamente. A suplementação de leucina e valina não influenciou ($P > 0,05$) os níveis séricos de ácido úrico, triglicerídeos, β -hidroxibutirato, proteínas totais, e albumina das aves. Os níveis séricos de amônia aumentaram linearmente ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de leucina digestível na dieta. Por sua vez, a suplementação de valina reduziu ($P < 0,05$) as concentrações séricas de amônia. Houve efeito linear decrescente ($P \leq 0,06$) e crescente ($P < 0,05$) dos níveis de leucina e valina, respectivamente, para as concentrações séricas de glicose. No experimento II (fase de crescimento), aos 42 dias de idade foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para o consumo de ração e ganho de peso. Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) dos níveis de leucina e valina digestíveis para a conversão alimentar, com ponto de mínima estimado nos níveis de 1,19 e 0,86%, respectivamente. O aumento dos níveis de leucina na dieta reduziu linearmente ($P < 0,05$) as concentrações séricas de triglicerídeos e corpos cetônicos, porém aumentou os níveis séricos de amônia. A suplementação de valina resultou em redução quadrática ($P \leq 0,07$) das concentrações séricas de amônia. A leucina permitiu maximizar o rendimento do peito no nível de 1,13%, enquanto que a valina otimizou o rendimento da coxa no nível de 0,78%. O teor

de gordura abdominal reduziu linearmente ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de leucina e valina na dieta. No experimento III (fase inicial), não houve ($P > 0,05$) interação entre os níveis de leucina e valina sobre a expressão do RNAm dos genes estudados no músculo *pectoralis major* das aves. A suplementação de leucina aumentou ($P < 0,05$) a expressão do RNAm dos genes mTOR e S6K1, entretanto, não afetou ($P > 0,05$) a expressão dos genes eIF4E•4EBP1 e eEF2 no músculo *pectoralis major* dos frangos. A adição de valina na dieta não influenciou ($P > 0,05$) a expressão dos genes estudados. No experimento IV (1-21 dias) e V (21-42 dias), não houve ($P > 0,05$) interação entre os níveis de leucina e valina sobre o diâmetro da fibra muscular do músculo *pectoralis major* das aves aos 21 e 42 dias de idade. A suplementação de leucina reduziu linearmente ($P < 0,05$) a área da zona de cartilagem hipertrófica da tíbia dos frangos aos 21 dias de idade. Foi observada interação ($P \leq 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para a resistência óssea da tíbia aos 21 dias, mas não aos 42 dias de idade ($P > 0,05$). Baseados na conversão alimentar, a exigência de leucina e valina digestível é de 1,29 e 0,91%, respectivamente, para frangos de corte na fase inicial, enquanto que em aves na fase de crescimento, a exigência de leucina e valina digestível é de 1,19 e 0,86%. A suplementação de leucina pode estimular a expressão do RNAm dos genes mTOR e S6K1 no músculo *pectoralis major* dos frangos de corte na fase inicial. Níveis adequados de leucina e valina podem ser essenciais na formação da estrutura óssea, resultando em ossos com maior resistência em frangos de corte no período de 1-21 dias de idade.

Palavras-chave: aminoácido de cadeia ramificada, amônia, corpo cetônico, expressão gênica, desempenho de frangos de corte, mTOR

ABSTRACT

Five experiments were performed to study the requirements and interactions between leucine and valine digestible in low-CP diets, and their effects on performance, serum and bone parameters, litter characteristics and mRNA expression of the genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 and eEF2, and fiber diameter of the *pectoralis major* muscle of broiler chickens. In the experiments II (1-21 days), III (21-42 days), IV (1-21 days) and V (21-42 days), a total of 1,500 1-day-old Cobb-Vantress® male broilers were distributed in a completely randomized experimental design in a 5x5 factorial arrangement with 25 treatments with three replicate pens of 20 birds each. Digestible leucine and valine levels ranged from 1.00 up to 1.96%, and 0.60 up to 1.20% for the starter phase, while for the grower phase ranged from 1.00 up to 1.80%, and 0.52 up to 1.12%, respectively. In the experiment III (1-21 days), a total of 540 1-day-old Cobb-Vantress® male broilers were distributed in a completely randomized experimental design in a 3x3 factorial arrangement with 9 treatments with three replicate pens of 20 birds each. Treatments consisted of three dietary levels of digestible leucine (1.00; 1.48 and 1.96 %) and three levels of digestible valine (0.60; 0.90 and 1.20 %). In the experiment I (starter phase), at 21 days interactions ($P < 0.05$) were observed between dietary leucine and valine levels for feed intake and feed:gain ratio. There was a quadratic effect ($P < 0.01$) of digestible leucine and valine levels on BW gain, with an optimization level of 1.28 and 0.92%, respectively. Valine and leucine supplementation did not affect ($P > 0.05$) the serum concentrations of uric acid, triglycerides, β -hydroxybutyrate, total protein and albumin of the birds. Serum levels of ammonia increased linearly ($P < 0.05$) with increasing levels of digestible leucine. However, valine supplementation reduced ($P < 0.05$) ammonia serum concentrations. Serum levels of glucose decreased and increased linearly ($P \leq 0.06$) with increasing levels of digestible leucine and valine, respectively. In the experiment II (grower phase), at 42 days interactions ($P < 0.05$) were observed between dietary leucine and valine levels for feed intake and BW gain. There was a quadratic effect ($P < 0.01$) of digestible leucine and valine levels on feed:gain ratio, with an optimization level of 1.19 and 0.86%, respectively. Leucine supplementation decreased ($P < 0.05$) serum concentrations of triglycerides and ketone bodies, but increased levels of serum ammonia. Valine supplementation resulted in quadratic reduction ($P \leq 0.07$) of the serum ammonia. Breast yield was maximized at the level of 1.13% leucine, while the leg yield was optimized at the level of 0.78% valine. Abdominal fat decreased linearly ($P < 0.05$) with increasing dietary levels of digestible leucine and valine. In the experiment III (starter phase), there was no interaction ($P > 0.05$) between the levels of leucine and valine on mRNA expression of the studied genes in chick pectoral muscle. Leucine supplementation increased ($P < 0.05$) mRNA expression of

mTOR and S6K1, however, did not affect ($P > 0.05$) mRNA expression of eIF4E•4EBP1 and eEF2 in *pectoralis major* muscle. Dietary valine did not affect ($P > 0.05$) the expression of the studied genes. In the experiment IV (1-21 days) and V (21-42 days), there was no interaction ($P > 0.05$) between the levels of leucine and valine on the fiber diameter of the *pectoralis major* muscle of the poultry at 21 and 42 days of age. Leucine supplementation decreased ($P < 0.05$) the hypertrophic zone of the growth plate of broilers at 21 days. There was an interaction ($P \leq 0.05$) between digestible levels of leucine and valine on tibia bone strength of broilers at 21 days, but not at 42 days of age ($P > 0.05$). Based on feed:gain ratio, digestible leucine and valine requirements were 1.29 and 0.91%, respectively, in low-CP diets for male broilers in the starter phase, while for the grower phase, the requirement for leucine and digestible valine were 1.19 and 0.86%. Leucine supplementation may stimulate mRNA expression of mTOR and S6K1 in pectoral muscle of broilers during the starter phase. Appropriate levels of leucine and valine can be essential in the formation of bone structure, resulting in increased resistance to bones in broilers during the period from 1-21 days of age.

Key words: ammonia, branched chain amino acid, gene expression, ketone body, mTOR, poultry performance

I - INTRODUÇÃO

A leucina, valina e isoleucina são considerados aminoácidos essenciais necessários para manutenção e crescimento tecidual, pertencentes ao grupo dos aminoácidos de cadeia ramificada (*Branched Chain Amino Acids* - BCAA), denominação esta por sua estrutura ramificada única.

Como outros aminoácidos essenciais, a principal função dos BCAA é participar da síntese de proteínas corporais. Porém, os BCAA desempenham outras funções fisiológicas importantes, incluindo a manutenção e crescimento do tecido muscular e a regulação da síntese de proteínas via a proteína alvo mecanístico de rapamicina (*mechanistic Target of Rapamycin* - mTOR) (Suryawan et al., 2011). Além disso, os BCAA estão entre os aminoácidos mais hidrofóbicos, assim, são substratos importantes na formação da estrutura de proteínas da membrana celular, em sua grande maioria, insolúveis em água (Brosnan & Brosnan, 2006).

Os BCAA constituem cerca de 40% do total dos aminoácidos essenciais no plasma sanguíneo e seu metabolismo é único e diferente de outros aminoácidos, pois os três BCAA compartilham as duas primeiras etapas do seu catabolismo e competem pelas mesmas enzimas de degradação (Harper et al., 1983).

Os BCAA são a principal fonte de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina (Holecek, 2002). A alanina pode ser oxidada a glicose no fígado e, juntamente com a glutamina, participa da síntese de proteínas musculares e da remoção de amônia dos tecidos (Murray et al., 2003). A glutamina possui várias outras funções importantes, incluindo a manutenção do equilíbrio ácido-base no rim (Schuldt et al., 1999), produção de glutathione (Yu et al., 1999) e participa da expressão das proteínas de choque térmico

(HSPs) (Hamiel et al., 2009). Igualmente, a glutamina é fonte primordial de energia para as células de divisão rápida, como o intestino e o sistema imunitário (Castell et al., 1994).

Os BCAA são importantes doadores de nitrogênio para a síntese do neurotransmissor excitatório, o glutamato, e o neurotransmissor inibitório, o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Hutson et al., 2005). Contudo, quantidades mínimas, quase insignificantes, de glutamato ou glutamina são transportadas do sangue para o cérebro. Portanto, é essencial que o cérebro sintetize glutamato devido à alta demanda deste aminoácido no tecido nervoso (Yudkoff et al., 2005). Aproximadamente, 30 a 50% dos grupos α -amino do glutamato e glutamina presentes no cérebro são derivados unicamente da leucina (Kanamori et al., 1998), aminoácido que pode passar a barreira hematoencefálica mais rapidamente do que qualquer outro (Smith et al., 1987).

1.1 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Semelhante aos outros aminoácidos, os BCAA não podem ser armazenados de forma livre nos tecidos, de modo que, após serem utilizados na síntese de proteínas, o excesso é oxidado. Contudo, os BCAA são os únicos aminoácidos oxidados em tecidos extra-hepáticos, principalmente, no tecido muscular (Platell et al., 2000), enquanto que os demais aminoácidos são oxidados no fígado.

O catabolismo dos BCAA acontece em duas etapas e suas vias catabólicas apresentam várias características em comum (Harper et al., 1983). A primeira etapa envolvida no catabolismo dos BCAA é sua transaminação reversível pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAT), processo no qual ocorre a transferência de um grupamento amino do aminoácido para o α -cetoglutarato, sendo o α -cetoglutarato transformado em glutamato e os BCAA convertidos em seus respectivos α -cetoácidos; a leucina em α -cetoisocaproato (KIC), a isoleucina em α -ceto- β -metilvalerato (KMV) e a valina em α -cetoisovalerato (KIV) (Islam et al., 2007; Wu et al., 2013) (Figura 1). O glutamato resultante pode ser utilizado na síntese de alanina e glutamina (Platell et al., 2000).

A BCAAT está presente tanto no citosol como na mitocôndria das células, no entanto, a localização da BCAAT citosólica limita-se ao tecido nervoso (Wiltafsky et al., 2010). A BCAAT aceita os três BCAA como substratos (Harper et al., 1983), porém, a enzima tem maior afinidade pela leucina, aminoácido transaminado no músculo com maior velocidade que os outros dois BCAA (Mimura et al., 1968). A atividade da BCAAT

é baixa no fígado, enquanto que no músculo é alta (Harper et al., 1983), motivo pelo qual, possivelmente, o catabolismo dos BCAA inicia no tecido muscular (Brosnan & Brosnan, 2006).

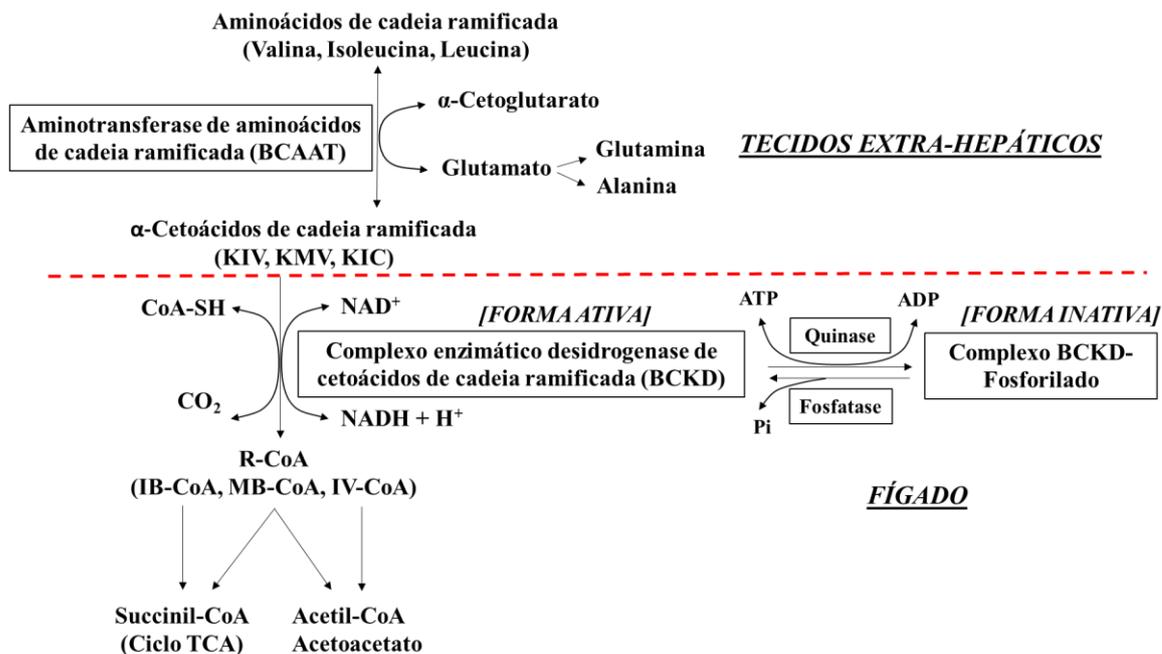


Figura 1. Vias catabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada. Adaptado de Brosnan & Brosnan (2006).

Na segunda etapa do catabolismo dos BCAA, os α -cetoácidos de cadeia ramificada sofrem descarboxilação oxidativa irreversível pela desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKD), complexo enzimático localizado na superfície interna da membrana mitocondrial (Brosnan & Brosnan, 2006). Deste modo, os α -cetoácidos de cadeia ramificada KIC, KMV e KIV são convertidos, respectivamente, em isovaleril-CoA, 3-metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA (produtos acil-CoA). Esta reação ocorre principalmente no fígado, pois é o órgão com maior atividade do complexo BCKD, seguido pelo rim e o coração, nos quais esse complexo apresenta atividade intermediária (Randle et al., 1984). Assim, a maior parte dos α -cetoácidos de cadeia ramificada produzidos por tecidos extra-hepáticos são liberados para a circulação sanguínea para serem absorvidos e metabolizados pelo fígado (Wu et al., 2013).

Diferente da enzima BCAAT, a atividade do complexo BCKD é altamente regulada, sendo inativado por fosforilação da sua subunidade E1 pela enzima desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada quinase (BCKD quinase) ou ativado por desfosforilação mediante a enzima BCKD fosfatase (Brosnan & Brosnan, 2006).

Dietas com baixa proteína aumentam a atividade da BCKD quinase (Harris et al., 2001), diminuindo assim, a degradação dos BCAA pela inativação do complexo BCKD. Esta resposta metabólica permite conservar os BCAA para a síntese de proteínas durante os períodos de baixa ingestão proteica (Shimomura et al., 2001).

Na fase final do metabolismo dos BCAA, ocorre a desidrogenação dos produtos acil-CoA resultantes da descarboxilação oxidativa (Harper et al., 1983). Após esta etapa, as vias catabólicas dos BCAA divergem-se, resultando assim, em produtos finais distintos. A leucina é exclusivamente cetogênica ao ser metabolizada em acetil-CoA e acetoacetato, a valina é glicogênica, uma vez que seu esqueleto de carbono é convertido em succinil-CoA, enquanto que a isoleucina é convertida em succinil-CoA ou acetoacetato e, portanto, pode ser considerada como um aminoácido glicogênico e cetogênico (Brosnan & Brosnan, 2006).

1.1.1 Antagonismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Existe um crescente interesse dos nutricionistas em compreender as interações, exigências e o metabolismo dos aminoácidos de BCAA nas aves. Conforme Harper (1983), os três aminoácidos são estruturalmente semelhantes, têm uma rota metabólica comum, compartilham os mesmos sistemas de transporte através da membrana celular e usam as mesmas enzimas para sua degradação.

A maioria das pesquisas disponíveis na literatura sobre os BCAA foram direcionadas a estudar o antagonismo entre estes aminoácidos (D'Mello & Lewis, 1970; Smith & Austic, 1978; Burnham et al., 1992; Farran et al., 2002), resultando na formulação de dietas experimentais com níveis extremadamente altos de leucina, o que resultou, na maioria das ocasiões, em redução no desempenho dos animais.

Vários ingredientes tradicionalmente utilizados na formulação de rações contêm altos teores de leucina (Figura 2). Alimentos ricos em PB como o farelo de soja, farinha de peixe e farelo proteínoso de milho, quando incluídos na formulação de ração, geralmente excedem às necessidades de leucina das aves, estando perto de 130–150% das exigências (Imanari et al., 2007).

Elevado conteúdo de leucina na dieta aumenta o catabolismo da valina e isoleucina, especialmente quando estes dois últimos aminoácidos estão em níveis marginais na dieta (D'Mello & Lewis, 1970). Altos níveis de leucina demonstraram aumentar a atividade do complexo BCKD (D'Mello & Lewis, 1970; Smith & Austic, 1978), complexo enzimático

chave envolvido na degradação dos três BCAA (Harris et al., 2001). Deste modo, o aumento da inclusão de leucina conduz à maior oxidação de valina e isoleucina, diminuindo as concentrações séricas destes aminoácidos.

Entretanto, o excesso dietético de leucina não parece influenciar intensamente a expressão gênica das enzimas envolvidas no catabolismo dos BCAA (Matsuzaki et al., 2005; Wiltafsky et al., 2010), de modo que, as respostas antagônicas induzidas por este aminoácido podem ser devidas aos metabólitos resultantes de sua degradação (Matsuzaki et al., 2005), afirmação que permite presumir que a leucina não influencia de forma direta o complexo BCKD, mas sim indiretamente através do seu α -cetoácido, o KIC.

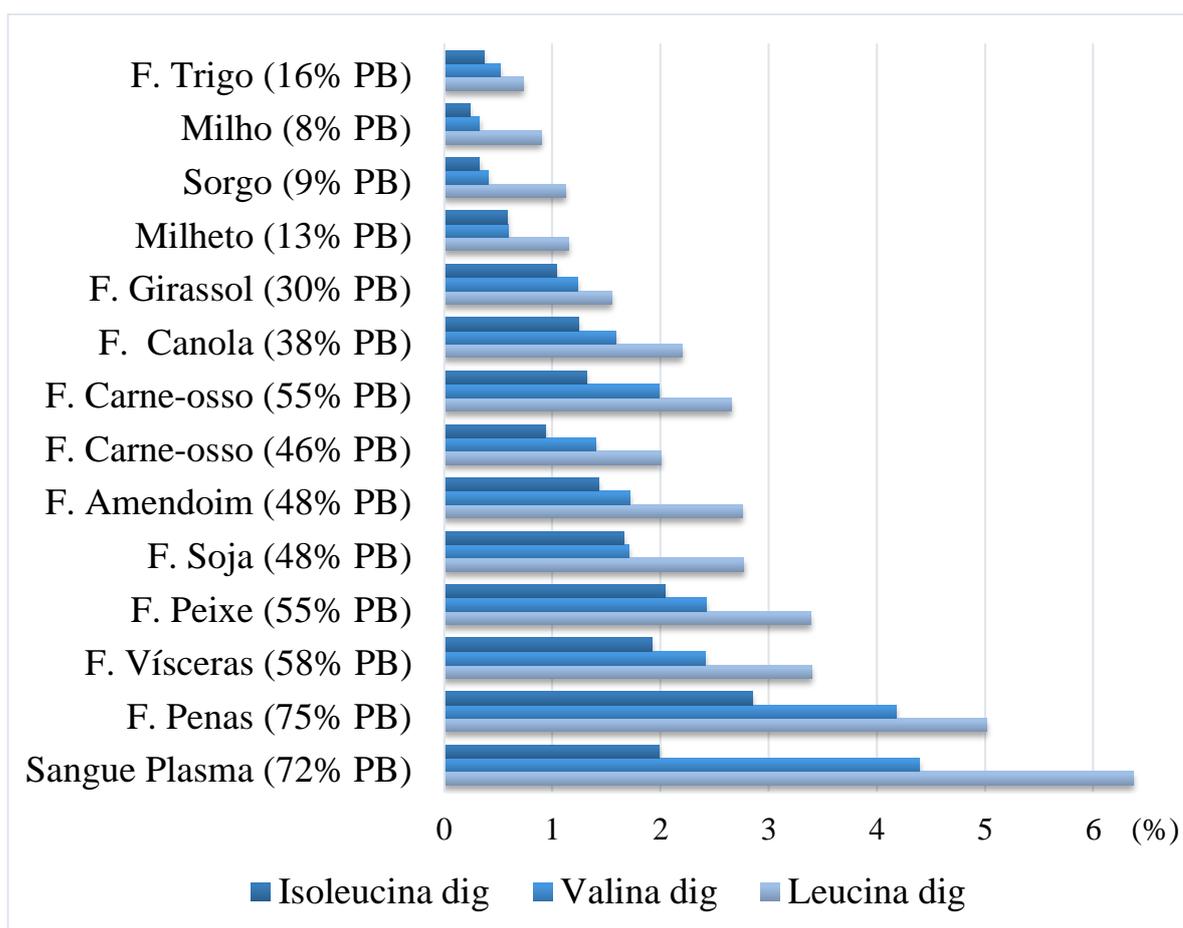


Figura 2. Conteúdo de leucina, valina e isoleucina digestível em alguns ingredientes utilizados na dieta de frangos de corte (Rostagno et al., 2011).

Níveis elevados de KIC inibem a enzima BCKD quinase, o que diminui a fosforilação do complexo BCKD, aumentando assim sua atividade (Harris et al., 2005) e, conseqüentemente, aumentando o catabolismo dos outros dois BCAA. O α -cetoisovalerato (KIV) e α -ceto- β -metilvalerato (KMV), α -cetoácidos da valina e

isoleucina, respectivamente, inibem também a BCKD quinase, mas com menor eficácia que o KIC (Brosnan & Brosnan, 2006).

Estudo prévio evidenciou redução do desempenho de galinhas poedeiras alimentadas com dietas contendo níveis excessivos de isoleucina (Peganova & Eder, 2003), no entanto, este efeito adverso foi atenuado com o aumento das concentrações dietéticas dos aminoácidos leucina e valina. Este resultado indica que o excesso de isoleucina também pode influenciar a atividade do complexo BCKD nas aves e, conseqüentemente, comprometer a eficiência de utilização da leucina e valina. Não obstante, altos níveis de valina não evidenciaram influenciar os outros dois BCAA (Allen & Baker, 1972; Baker, 1977).

A constante de Michaelis (K_m) das enzimas BCAAT e BCKD são maiores para a valina do que para a leucina e isoleucina (Harper et al., 1983). A K_m está indiretamente associado com a afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto maior o valor de K_m menor será a afinidade (Ames et al., 2002). Deste modo, o maior valor K_m das duas primeiras enzimas envolvidas no catabolismo dos BCAA (BCAAT e BCKD) para a valina e, portanto, sua menor afinidade, poderia explicar, em parte, as pequenas mudanças das concentrações plasmáticas dos outros dois BCAA em animais alimentados com altos níveis de valina, resposta que também pode estar relacionada à pouca influência do KIV (α -cetoácido da valina) sobre a BCKD quinase.

Baseado nos resultados obtidos por alguns pesquisadores (D'Mello & Lewis, 1970; Allan & Baker, 1972), é possível afirmar que nas aves o excesso dietético de leucina compromete a eficiência de utilização da valina em maior intensidade do que da isoleucina.

Alta mortalidade foi evidenciada por Farran & Thomas (1992a) em aves submetidas a dietas com desequilíbrio nos níveis de leucina e valina, mas não em dietas com desbalanço entre a leucina e isoleucina. Este resultado suporta a hipótese de que a interação leucina-valina é mais potente nas aves. No entanto, a interação leucina-isoleucina é metabolicamente mais potente que a interação leucina-valina em suínos (Langer & Fuller, 2000) e ratos (Benton et al., 1956), indicando que as duas espécies respondem de forma diferente às aves quando submetidas a dietas com altos níveis de leucina.

Dietas para frangos de corte contendo 3% de leucina reduzem a eficiência de utilização da isoleucina e da valina em 20 e 25%, respectivamente (Allan & Baker, 1972), diminuem o ganho de peso e pioram a conversão alimentar das aves (Farran et al., 2002).

Não obstante, estes efeitos negativos não são encontrados quando estas dietas são suplementadas com valina e isoleucina em níveis 40% acima da exigência (Farran et al., 2002).

Wiltafsky et al. (2010) relacionaram a diminuição do ganho de peso em animais alimentados com o excesso de leucina à alteração do eixo hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), uma vez que encontraram, em um dos seus experimentos, redução na expressão gênica dos receptores do GH e IGF-1 no fígado de suínos com o aumento do nível de leucina na dieta. Porém, em outra pesquisa realizada por Wiltafsky et al. (2010) não encontraram nenhum efeito da leucina sobre a expressão do RNAm dos receptores do GH e IGF-1 no fígado ou no músculo. Estas divergências de resultados não permitem corroborar totalmente a hipótese de que a diminuição no ganho de peso, em dietas com altos níveis de leucina, seja devido a mudanças do eixo GH - IGF-1.

O IGF-1 das aves é constituído por uma cadeia polipeptídica com 70 aminoácidos (Ballard et al., 1990). Portanto, alterações nos níveis de proteína e de aminoácidos na dieta podem alterar facilmente a concentração plasmática e a expressão hepática do IGF-1 (Kita et al., 2005). Possivelmente, reduções do eixo GH – IGF-1 sejam consequência da redução dos níveis circulantes de valina e isoleucina pelo excesso de leucina, e não de um efeito direto da leucina sobre este eixo hormonal. Dietas deficientes de aminoácidos essenciais, mesmo com níveis de proteína adequado, podem reduzir a expressão de RNAm do IGF-I e os níveis plasmáticos deste hormônio (Kita et al., 2002).

Embora a suplementação de altos níveis de leucina influencie negativamente o ganho de peso das aves, a redução do consumo de ração é o efeito negativo mais reportado na literatura em estudos com aves (Calvert et al., 1982; Farran et al., 2002), suínos (Gatnau et al., 1995; Wiltafsky et al., 2010) e ratos (Shinnick & Harper, 1977), sendo considerada esta resposta o principal efeito tóxico originado pelo excesso de leucina na dieta (Ueda et al., 1981).

Utilizando a metodologia de alimentação forçada, Calvert et al. (1982) determinaram que aproximadamente 70% do menor ganho de peso em aves alimentadas com altos níveis de leucina (5,0% de leucina total) era causa da menor ingestão de alimento.

A estimulação do catabolismo dos BCAA pelo excesso de leucina, além de reduzir o “pool” sanguíneo de valina e isoleucina, também pode diminuir a quantidade de triptofano disponível para a síntese de serotonina no tecido cerebral (Fernstrom, 2005;

Choi et al., 2013), bem como, aumentar a síntese de corpos cetônicos no fígado (Kulaylat et al., 1988), possíveis fatores responsáveis, em parte, da menor ingestão de alimentos e o retardo do crescimento em animais alimentados com altos níveis de leucina (Htoo & Wiltafsky, 2012).

Erwan et al. (2009) não evidenciaram redução no crescimento de frangos de corte na fase de 21-42 dias idade após a suplementação de 0,7% de leucina (2,34% de leucina total) em dietas com níveis adequados de valina e isoleucina.

Igualmente, um nível de 4% de leucina total em dietas ricas em PB (25,5%), com níveis de valina e isoleucina de acordo ou acima da exigência, não induziram toxicidade em frangos de corte na fase inicial (Farran et al., 2002). Pelo contrário, D'Mello & Lewis (1970) encontraram que aves suplementadas com 2,9% de leucina em uma dieta baixa em PB (20%), apresentaram redução no desempenho.

Deste modo, pode-se pensar que as aves são mais susceptíveis a níveis elevados de leucina em dietas com baixo conteúdo proteico. A progressiva redução da PB dietética pode levar à deficiência dos aminoácidos conhecidos literalmente como “menos limitantes”, os quais são geralmente supridos por dietas com níveis normais de PB (Peganova & Eder, 2002), tal é o caso da valina e isoleucina. Entretanto, ao serem oferecidos níveis adequados de isoleucina às exigências dos frangos de corte é pouco provável que níveis altos de leucina ou valina diminuam o crescimento das aves (Burnham et al., 1992).

1.2 Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre as fibras musculares

Sabe-se que os BCAA servem como “blocos de construção” das proteínas nos tecidos (Rogerio & Tirapegui, 2008). Durante períodos de baixa ingestão de proteína, a menor disponibilidade de BCAA pode limitar a síntese proteica celular, porque estes aminoácidos estão contidos em quase todas as proteínas do corpo (Shimomura & Harris, 2006).

Níveis adequados de BCAA no tecido musculoesquelético são primordiais para o crescimento das fibras musculares, uma vez que os BCAA representam 35% dos aminoácidos essenciais presentes nas proteínas do músculo (Harper et al., 1983; Marchini et al., 1998). A concentração dos BCAA dentro do tecido muscular varia conforme o tipo de fibra, sendo 20-30% maior nas fibras de contração lenta (fibras vermelhas) em comparação àquelas de contração rápida (fibras brancas) (Rogerio & Tirapegui, 2008).

O crescimento dos animais é acompanhado por mudanças no tamanho e na proporção das fibras musculares (Ashmore et al., 1972). Após o desenvolvimento embrionário, o crescimento das fibras musculares ocorre apenas por hipertrofia, este aumento do diâmetro da fibra muscular resulta, principalmente, da maior deposição de proteínas miofibrilares (actina e miosina) (Ashmore et al., 1972), sendo estas proteínas compostas principalmente de BCAA (Shimomura & Harris, 2006).

Três tipos de fibras foram identificadas por histoquímica nas musculaturas das aves: tipo I –fibra contração lenta e oxidativa; tipo IIA – contração rápida oxidativa e glicolítica; e tipo IIB – contração rápida e glicolítica (Dubowitz & Brooke, 1984).

Considerando que os BCAA são metabolizados primeiramente no músculo esquelético e que são fonte importante de energia e substratos para a síntese proteica muscular, sua suplementação poderia influenciar o diâmetro das fibras musculares nas aves.

Em suínos, a suplementação de leucina aumentou a síntese de proteínas nas fibras musculares com metabolismo glicolítico, oxidativo e glicolítico-oxidativo (Suryawan et al., 2012), o que provavelmente resultou em um aumento de seu diâmetro.

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (Potença et al., 2015), a suplementação de valina aumentou o tamanho das fibras do músculo *flexor hallucis longus* da coxa, porém o aminoácido não influenciou a frequência destas fibras. Este resultado indica que a valina pode interferir no crescimento do tecido muscular, aumentando o tamanho das fibras músculo esqueléticas sem induzir mudanças em seu perfil.

1.3 Aminoácidos de cadeia ramificada no metabolismo ósseo

Relações adequadas de BCAA são essenciais para que os osteoblastos formem a matriz óssea, bem como para facilitar a calcificação e proliferação das células do osso (Farran & Thomas, 1992a).

A restrição de leucina em ratos demonstrou reduzir a proliferação e diferenciação dos condrócitos na placa de crescimento (Kim et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Phornphutku et al. (2008) ao submeterem células do metatarso de ratos *in vitro* a rapamicina, um potente inibidor do mTOR, sugerindo que o mTOR é uma proteína importante para modular o crescimento ósseo. A leucina é o nutriente mais eficaz para ativar o mTOR (Kimball & Jefferson, 2006). Portanto, a restrição deste aminoácido

pode comprometer o desenvolvimento ósseo, visto que bloqueia a sinalização da via mTOR (Kim et al., 2008).

Campos-Ferraz et al. (2011) encontraram redução na síntese de proteoglicanos na cartilagem de ratos submetidos a atividade física constante. Contudo, a suplementação de BCAA permitiu atenuar essa redução.

A proporção orgânica da matriz óssea é constituída por grande quantidade de fibras colágenas de tipo I e de glicoproteínas e proteoglicanos. Os proteoglicanos desempenham um papel importante na organização da matriz extracelular óssea, participando da estruturação do próprio tecido como reguladores ativos da formação das fibras de colágeno (Lamoureux et al., 2007). Além disso, os proteoglicanos têm a função de dar rigidez à matriz óssea, proporcionando resistência à compressão e preenchendo espaços (Baud'Huin et al., 2012).

Dentre as famílias de proteoglicanos presentes na matriz óssea, os pequenos proteoglicanos ricos em leucina são os mais abundantes (Lamoureux et al., 2007). Dessa forma, dietas com baixos níveis de leucina poderiam reduzir a síntese destes importantes componentes do tecido ósseo. Contudo, é pouco provável obter níveis marginais de leucina em dietas práticas para aves.

Além da leucina, a valina pode também influenciar o metabolismo ósseo. Farran & Thomas (1992a) encontraram redução nas concentrações ósseas de cálcio e cinza e menor peso dos ossos em aves alimentadas com dietas deficientes em valina, sugerindo uma diminuição na atividade dos osteoblastos decorrente dos baixos níveis do aminoácido.

O papel dos BCAA sobre o metabolismo ósseo tem sido pouco estudado e não está claro se os BCAA podem interferir no desenvolvimento dos ossos das aves e qual é seu mecanismo de ação, desta forma, há a necessidade de novas pesquisas com intuito de esclarecer essas questões.

1.4 Exigências dos aminoácidos leucina e valina nos frangos de corte

Múltiplas pesquisas determinaram as exigências de valina e isoleucina em frangos de corte (Farran & Thomas, 1990; Corzo et al., 2004; Hale et al., 2004; Corzo et al., 2007; Mejia et al., 2011; Tavernari et al., 2013; Potença et al., 2015). No entanto, poucos estudos foram focados em determinar as exigências de leucina, visto que na indústria, a formulação de dietas práticas para aves, comumente excedem as exigências deste aminoácido.

Pouca importância tem sido dada à leucina, não só pela dificuldade de induzir uma deficiência drástica deste aminoácido na dieta, devido ao alto teor de leucina nos ingredientes, mas também pela maior importância outorgada aos aminoácidos valina e isoleucina por serem considerados o quarto e quinto aminoácido limitante, respectivamente, em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte (Baker et al., 2002; Kidd et al., 2004; Kidd & Hackenhaar, 2006; Corzo et al., 2009).

Vários estudos demonstraram que existem inter-relações entre os BCAA (Allan & Baker, 1972; Calvert et al., 1982), sendo suas exigências influenciadas pelo antagonismo existente entre estes (Farran & Thomas, 1990b), mesmo assim, alguns estudos determinaram as exigências dos BCAA de forma isolada, sem considerar suas interações.

A estimativa do nível de valina digestível para frangos de corte na fase inicial na literatura varia de 0,74 a 0,91% (Baker et al., 2002; Corzo et al., 2008; Rostagno et al., 2011; Nascimento et al., 2015), enquanto que no período de crescimento oscila de 0,65 a 0,85% (Mack et al., 1999; Thornton et al., 2006; Corzo et al., 2007; Corzo et al., 2008; Tavernari et al., 2013; Nascimento et al., 2015), indicando que ainda existem algumas discrepâncias sobre as exigências de valina nas diferentes fases de criação. Possivelmente, parte destas diferenças seja devido a variações no teor de leucina na dieta destes estudos, porém nenhuma destas pesquisas consideraram este importante fator (Mack et al., 1999; Baker et al., 2002; Thornton et al., 2006; Corzo et al., 2007; Corzo et al., 2008; Tavernari et al., 2013).

Cabe ressaltar que as discrepâncias nas estimativas da exigência de valina são também devidas a diferenças na linhagem, sexo, idade das aves, tipos de ingredientes e outros fatores já discutidos amplamente com anterioridade na literatura.

Thornton et al. (2006) encontraram aumento linear no ganho de peso e eficiência alimentar, em frangos de corte machos no período de 21-42 dias de idade, com o aumento dos níveis digestíveis de valina (0,57 – 0,77%) em dietas com menor nível proteico (15,4%). No entanto, apesar de não ter encontrado respostas quadráticas, Thornton et al. (2006) recomendaram níveis de valina digestíveis de 0,65% para um adequado desempenho.

As estimativas das exigências de leucina na literatura são escassas, sendo na grande maioria determinadas com dietas pouco convencionais. Nesse contexto, Farran & Thomas (1990) determinaram exigências de leucina totais de 1,16% em frangos de corte alimentados com dietas semi-purificadas na fase de 7-21 dias, considerando o ganho de peso e a conversão alimentar. Da mesma forma, D'Mello (1974) determinou exigências

de leucina totais de 1,10% em dietas a base de trigo e farelo de amendoim para frangos de corte na fase de 1-21 dias de idade.

O NRC (1994) recomenda níveis de leucina total de 1,09% para frangos de corte na fase de 21-42 dias, baseados apenas na exigência de lisina para este período (21-42 dias) e na relação leucina:lisina da fase de 1-21 dias. Provavelmente, esta recomendação deve-se à falta de dados experimentais, pois na fase de crescimento (21-42 dias) são ainda mais limitadas as pesquisas direcionadas a estudar os níveis ideais de leucina na dieta.

1.5 Papel da leucina na estimulação da síntese proteica celular

Embora altos níveis de leucina causem efeitos antagônicos sobre os outros BCAA e aumente suas exigências, pesquisas biomédicas e farmacêuticas demonstraram que a leucina possui importantes propriedades anabólicas, sendo este fenômeno considerado “paradoxo da leucina” (Shimomura & Harris, 2006; Vianna et al., 2010).

Nesse sentido, dentre todos os aminoácidos, a leucina é a mais eficaz em estimular a síntese proteica, uma vez que este aminoácido estimula a fase de iniciação da tradução do RNAm em proteína, por processos dependentes e independentes de insulina (Proud, 2002; Kimball & Jefferson, 2006) (Figura 3).

Do mesmo modo, a leucina apresenta propriedades anabólicas celulares ao estimular a síntese e a secreção de insulina (Vianna et al., 2010), que junto com a leucina, este hormônio tem um efeito sinérgico na manutenção da síntese proteica muscular (Kimball & Jefferson, 2006).

A leucina estimula a tradução de proteínas mediante a ativação da proteína serina/treonina quinase conhecida como alvo mecanístico de rapamicina (*mechanistic Target of Rapamycin* - mTOR). O mTOR favorece o acréscimo da síntese proteica através da fosforilação da proteína ribossomal S6 quinase 1 (S6K1) e da proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1), duas proteínas que compreendem a fase de iniciação da síntese proteica (Lynch et al., 2002).

Altos níveis de leucina no plasma de suínos, ratos e humanos têm demonstrado ativar o receptor intracelular da mTOR (Crozier et al., 2005; Glynn et al., 2010; Torrazza et al., 2010; Suryawan et al., 2012). A ativação do mTOR culmina em última instância, em aumento da taxa de síntese proteica, crescimento e proliferação celular (Richards et al., 2010). Contudo, a leucina não só estimula a síntese proteica, mas também diminui a proteólise celular (Shimomura & Harris, 2006; Zanchi et al., 2008; Vianna et al., 2010).

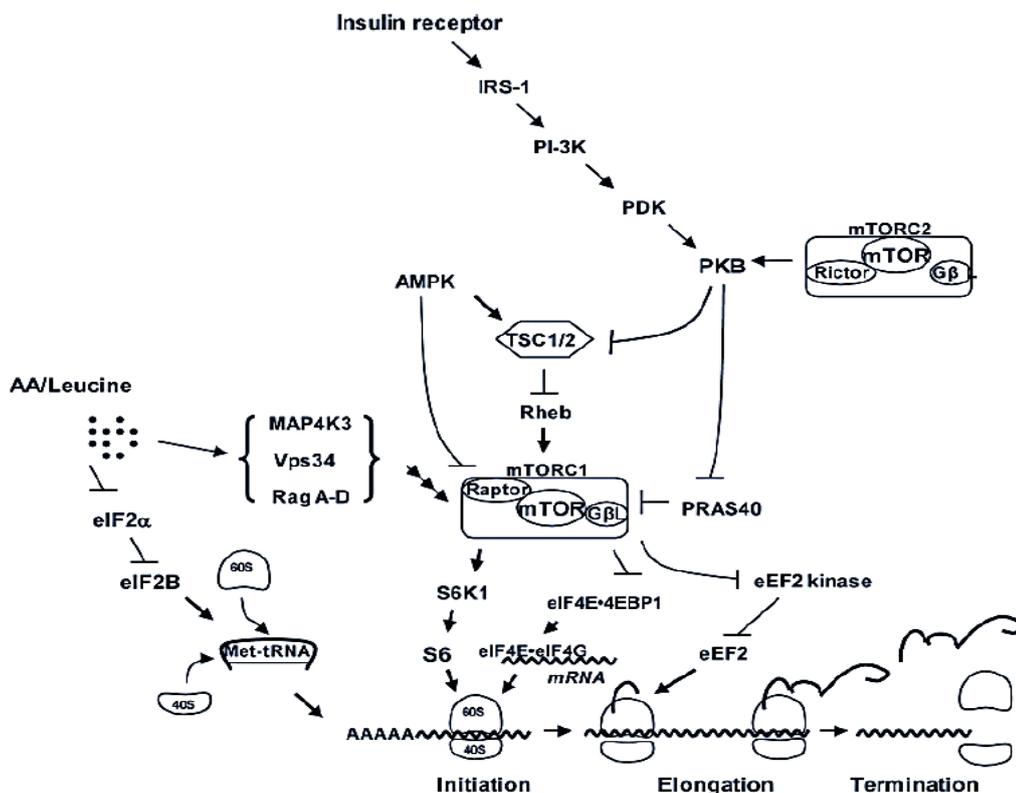


Figura 3. Mecanismo de ação da leucina e insulina na tradução do RNAm no citoplasma das células eucarióticas (Suryawan et al., 2011).

IRS-1= substrato receptor de insulina 1; PI-3K= fosfoinositídeo 3-quinase; PDK= fosfoinositídeo quinase dependente 1; PKB= proteína quinase B; MAP4K3= proteína quinase 3 ativada por mitógenos; Vps34= proteína vacuolar 34; eIF= fator de iniciação eucariótica; mTOR= proteína alvo da rapamicina em mamíferos; eEF2= fator de elongação eucariótica 2; PRAS-40= Akt substrato rico em prolina 40kDa; Rheb= Ras homólogo enriquecido no cérebro; TSC/2= complexo da esclerose tuberosa; S6K1= proteína quinase ribossomal S6 ; AMPK = proteína quinase ativado por adenosina monofosfato.

Torrazza et al. (2010) encontraram que a suplementação de leucina, em dietas com baixo teor de proteína para leitões, estimulou a taxa de síntese proteica nos músculos *longissimus dorsi*, gastrocnêmio e masseter e, nos órgãos viscerais como coração, jejuno, rim e pâncreas. Resultado semelhante foi descrito por Escobar et al. (2006), que compararam a capacidade anabólica dos três BCAA e, verificaram que apenas administração de leucina foi eficiente para estimular a síntese proteica muscular em leitões.

Pesquisas prévias indicaram que as aves expressam amplamente o TOR, um gene homólogo ao mTOR em mamíferos, localizado no cromossoma 21 das aves (Tesseraud et al., 2003; Richards & Proszkowiec-Weglarz, 2007). Igualmente, assim como em mamíferos, a leucina também ativa a fosforilação da proteína S6K1 nas aves (Bigot et al.,

2003; Everaert et al., 2010). Portanto, a suplementação de leucina em frangos de corte poderia estimular a síntese proteica da mesma maneira como ocorre nos mamíferos.

Apesar de alguns estudos indicarem a existência e o funcionamento da sinalização hipotalâmica via TOR em aves, a compreensão de como sua atividade é regulada é indefinida. Tesseraud et al. (2003) afirmaram que a leucina regula a fosforilação da proteína S6K1 e a síntese proteica no mioblasto de codornas através do mTOR e/ou o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase), por processos independentes de insulina. Estes autores encontraram que a aplicação de rapamicina (inibidor de mTOR) na linha celular de mioblastos de codornas bloqueou a fosforilação da proteína S6K1 e, por conseguinte, a síntese de proteínas. Este resultado corrobora a existência de um homólogo mTOR nas aves.

Erwan et al. (2008) não evidenciaram efeitos adversos da suplementação dietética de 0,5% de leucina (2,16% de leucina) sobre o desempenho de frangos de corte, entretanto, o peso da carcaça aumentou 9% comparado com a dieta contendo o nível controle (1,61% de leucina), possivelmente, o aumento no rendimento de carcaça foi devido ao efeito anabólico da leucina sobre os tecidos celulares.

Do mesmo modo, diversos efeitos positivos dos metabólitos da leucina têm sido reportados na literatura. Estes metabólitos são o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) e o KIC (Zanchi, et al., 2008). Após a transaminação da leucina no KIC, este α -cetoácido pode sofrer oxidação irreversível a isovaleril-CoA mediado pelo complexo BCKD presente na superfície da membrana interna mitocondrial, ou alternativamente ser oxidado a HMB pela enzima KIC dioxigenase no citosol (Nissen & Abumrad, 1997).

Tanto o HMB como o KIC têm demonstrado aumentar a síntese proteica muscular, bem como inibir degradação de proteínas em humanos, ratos, aves e suínos (Shiota et al., 1989; Ostaszewski et al., 2000; Panton et al., 2000; Moore et al., 2005; Smith et al., 2005; Zanchi, et al., 2008; Vianna et al., 2010). Em síntese, a leucina poderia servir como um substrato direto para a síntese de proteínas no tecido ou indireto mediante seus metabólitos.

REFERÊNCIAS

- Allan, N. K., and D. H. Baker. 1972. Quantitative efficacy of dietary isoleucine and valine for chick growth as influenced by variable quantities of excess dietary leucine. *Poult. Sci.* 51:1292-1298.
- Ames, B. N., I. Elson-Schwab, and E. A. Silver. 2002. High-dose vitamin therapy stimulates variant enzymes with decreased coenzyme binding affinity (increased Km): relevance to genetic disease and polymorphisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 75(4):616-658.
- Ashmore, C. R., G. Tompkins, L. Doerr. 1972. Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. *Anim. Sci. J.* 34:37-41.
- Ballard, F. J., R. J. Johnson, P. C. Owens, G. L. Francis, F. Z. Upton, J. P. McMurtry, and J. C. Wallace. 1990. Chicken insulin-like growth factor-I: Amino acid sequence, radioimmunoassay, and plasma levels between strains and during growth. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79:459-468.
- Baker, D. H. 1977. Amino acid nutrition of the chick. In: *Advances in Nutrition Research*. Pages 299, New York.
- Baker, D. H., A. B. Batal, T. M. Parr, N. R. Augspurger, and C. M. Parsons. 2002. Ideal ratio (relative to lysine) of tryptophan, threonine, isoleucine, and valine for chicks during the second and third weeks posthatch. *Poult. Sci.* 81:485-494.
- Baud'Huin, M., C. Charrier, G. Bougras, R. Brion, F. Lezot, M. Padrines, D. Heymann. 2012. Proteoglycans and osteolysis. *Methods Mol. Biol.* 836:323-37.
- Benton, D. A., A. E. Harper, H. E. Spivey, C. A. Elvehjem. 1956. Leucine, isoleucine and valine relationships in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 60:147-155.
- Bigot, K., M. Taouis, S. Tesseraud. 2003. Refeeding and insulin regulate S6K1 activity in chicken skeletal muscles. *J. Nutr.* 133:369-373.
- Brosnan, J. T., M. E. Brosnan. 2006. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J. Nutr.* 136:207S-211S.
- Burnham, D., G. C. Emmans, and R. M. Gous. 1992. Isoleucine requirements of the chicken: The effect of excess leucine and valine on the response to isoleucine. *Br. Poult. Sci.* 33:71-87.
- Calvert, C. C., K. C. Klasing, and R. E. Austic. 1982. Involvement of food intake and amino acid catabolism in the branched-chain amino acid antagonism in chicks. *J. Nutr.* 112:627-635.
- Campos-Ferraz, P. L., S. M. Ribeiro, S. S. Luz, A. H. Lancha Jr, J. Tirapegui. 2011. Exercise x BCAA supplementation in young trained rats: What are their effects on body growth? *J. Sports Sci. Med.* 10:483-90.
- Castell, L. M., S. J. Bevan, P. Calder, E. A. Newsholme. 1994. The role of glutamine in the immune system and in intestinal function in catabolic states. *Amino Acids.* 7(3):231-43.
- Choi, S., B. Disilvio, M. H. Fernstrom, J. D. Fernstrom. 2013. Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. *Amino Acids.* 45:1133-42.
- Corzo, A., M. T. Kidd, W. A. Dozier, and S. L. Vieira. 2007. Marginality and Needs of Dietary Valine for Broilers Fed Certain All-Vegetable Diets. *J. Appl. Poult. Res.* 16: 546-554.

- Corzo, A., W. A. Dozier III, and M. T. Kidd. 2008. Valine nutrient recommendations for Ross × Ross 308 broilers. *Poult. Sci.* 87:335–338.
- Corzo, A. R., E. Loar II, and M. T. Kidd. 2009. Limitations of dietary isoleucine and valine in broiler chick diets. *Poult. Sci.* 88:1934-1938.
- Crozier, S. J., S. R. Kimball, S. W. Emmert, J. C. Anthony, L. S. Jefferson. 2005. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 135:376-382.
- D'Mello, J. P. F., D. Lewis. 1970. Amino acid interactions in chick nutrition. 2. Interrelationships between leucine, isoleucine, and valine. *Br. Poult. Sci.* 11:313-323.
- D'Mello, J. P. F. 1974. Plasma concentrations and dietary requirements of leucine, isoleucine and valine: Studies with the young chick. *J. Sci. Food Agric.* 25:187.
- Erwan, E., A. R. Alimon, A. Q. Sazili, and H. Yaakub. 2008. Effect of varying levels of leucine and energy on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 7:696-699.
- Erwan, E., A. R. Alimon, A. Q. Sazili, H. Yaakub and M. Hilmi. 2009. Effect of L-Leucine supplementation on growth performance and carcass characteristics of grower-broiler chickens fed low protein diets. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 4:95-100.
- Escobar, J., J. V. W. Frank, A. Survawan, H. V. Nguven, S. R. Kimball, L. S. Jefferson, T. A. Davis. 2006. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acid in neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290:612-621.
- Everaert, N., Q. Swennen, S. M. Coustard, H. Willemsen, C. Careghi, J. Buyse, V. Bruggeman, E. Decuypere, S. Tesseraud. 2010. The effect of the protein level in a pre-starter diet on the post-hatch performance and activation of ribosomal protein S6 kinase in muscle of neonatal broilers. *Br. J. Nutr.* 103:206-211.
- Farran, M. T., and O. P. Thomas. 1990. Dietary requirements of leucine, isoleucine, and valine in male broilers during the starter period. *Poult. Sci.* 69:757-762.
- Farran, M. T., O. P. Thomas. 1992a. Valine deficiency. 2. The effect of feeding a valine-deficient diet during the starter period on performance and leg abnormality of male broiler chicks. *Poult. Sci.* 71(11):1885-90.
- Farran, M. T., O. P. Thomas. 1992b. Valine deficiency. 1. The effect of feeding a valine-deficient diet during the starter period on performance and feather structure of male broiler chicks. *Poult. Sci.* 71(11):1879-84.
- Farran, M. T., E. K. Barbour, and V. M. Ashkarian. 2002. Effect of excess leucine in low protein diet on ketosis in 3-week-old male broiler chicks fed different levels of isoleucine and valine. *Anim. Feed Sci. Technol.* 103:171-176.
- Fernstrom, J. D. 2005. Branched-chain amino acids and brain function. *Journal of Nutrition.* v.135, p.1539S–1546S.
- Gatnau, R., D. R. Zimmerman, S. L. Nissen, M. Wannemuehlert, and R. C. Ewan. 1995. Effects of excess dietary leucine and leucine catabolites on growth and immune responses in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 73:159-165.
- Glynn, E. L., C. S. Fry, M. J. Drummond, K. L. Timmerman, S. Dhanani, E. Volpi, B. B. Rasmussen. 2010. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J. Nutr.* 140:1970-1976.
- Hale, L. L., G. T. Pharr, S. C. Burgess, A. Corzo, and M. T. Kidd. 2004. Isoleucine needs of thirty- to forty-day-old female chickens: immunity. *Poult. Sci.* 83:1979-1985.
- Hamiel, C. R., S. Pinto, A. Hau, and P. E. Wischmeyer. 2009. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 297:C1509–C1519.

- Harper, A. E., K. P. Block, T. C. Cree. 1983. Branched-chain amino acids: Nutritional and metabolic interrelationships. Pages 159-183 in *Protein Metabolism and Nutrition*. M. Arnal, R. Pion, D. Bonin. 4. ed. Paris: INRA.
- Harris, R. A., R. Kobayashi, T. Murakami, Y. Shimomura. 2001. Regulation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. *J Nutr.* 131(3):841S-845S.
- Harris, R. A., M. Joshi, N. H. Jeoung, M. Obayashi. 2005. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.* 135:1527S-1530S.
- Holecek, M. 2002. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition.* 18:130-133.
- Htoo, J., M. Wiltafsky. 2012. Branched-chain amino acids in broiler nutrition. *Aminonews.* 16:25-32.
- Hutson, S. M., A. J. Sweatt, and K. F. LaNoue. 2005. Branched-chain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *J. Nutr.* 135:1557S-1564S.
- Islam, M. M., R. Wallin, R. M. Wynn, M. Conway, H. Fujii, J. A. Mobley, D. T. Chuang, S. M. Hutson. 2007. A novel branched-chain amino acid metabolon. Protein-protein interactions in a supramolecular complex. *J. Biol Chem.* 282(16):11893-903.
- Imanari, M., M. Kadowaki, and S. Fujimura. 2007. Regulation of taste-active components of meat by dietary leucine. *Br. Poult. Sci.* 48:167-176.
- Kanamori, K., B. D. Ross, and R. W. Kondrat. 1998. Rate of glutamate synthesis from leucine in rat brain measured in vivo by ¹⁵N NMR. *J. Neurochem.* 70:1304-1315.
- Kidd, M. T., D. J. Burnham, B. J. Kerr. 2004. Dietary isoleucine responses in male broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45:67-75.
- Kidd, M. T., L. Hackenhaar. 2006. Dietary threonine for broilers: Dietary interactions and feed additive supplement use. *CAB Reviews.* 1:6.
- Kim, M. S., K. Y. Wu, V. Auyeung, Q. Chen, P. A. Gruppuso, C. Phornphutkul. 2009. Leucine restriction inhibits chondrocyte proliferation and differentiation through mechanisms both dependent and independent of mTOR signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296(6):E1374-82.
- Kimball, S. R., L. S. Jefferson. 2006. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 136:227-231.
- Kita, K., T. Shibata, K. Nagao, J. Hwangbo, and J. Okumura. 2002. Effects of refeeding with protein-free diets supplemented with various essential amino acids on the plasma insulin-like growth factor-I concentration in fasted young chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15:406-409.
- Kita K, K. Nagao, and J. Okumura. 2005. Nutritional and tissue specificity of IGF-I and IGFBP-2 gene expression in growing chickens - A Review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18: 747-754.
- Kulaylat, M. N., Frexes-Steed, M., R. Geer, P. E. Williams, N. N. Abumrad. 1988. The role of leucine in hepatic ketogenesis. *Surgery.* 103:351-60.
- Langer, S., M. F. Fuller. 2000. Interactions among the branched-chain amino acids and their effects on methionine utilization in growing pigs: Effects on nitrogen retention and amino acid utilization. *Br. J. Nutr.* 83:43-48.
- Lamoureux, F., M. Baud'huin, L. Duplomb, D. Heymann, F. R dini. 2007. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays.* 29:758-771.
- Lynch, C. J., B. J. Patson, J. Anthony, A. Vaval, L. S. Jefferson, T. C. Vary. 2002. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 283:E503-13.

- Mack, S., D. Bercovici, G. DeGroote, B. Leclercq, M. Lippens, M. Pack, J. B. Schutte, and S. Van Cauwenberghe. 1999. Ideal amino acid profile and dietary lysine specification for broiler chickens of 20 to 40 days of age. *Br. Poult. Sci.* 40:257–265.
- Marchini, J. S., J. C. Moriguti, G. J. Padovan, C. B. Nonino, S. M. L. Vianna, J. E. D. Oliveira. 1998. Métodos atuais de investigação do metabolismo proteico: Aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. *Medicina.* 31:22-30.
- Matsuzaki, K., H. Kato, and R. Sakai. 2005. Transcriptomics and metabolomics of dietary leucine excess. *J. Nutr.* 135:1571S–1575S.
- Mejia, L., C. D. Zumwalt, E. J. Kim, P. B. Tillman, and A. Corzo. 2011. Digestible isoleucine-to-lysine ratio effects in diets for broilers from 4 to 6 weeks posthatch. *J. Appl. Poult. Res.* 20(4):485-490.
- Mimura, T., C. Yamada, and M. E. Swendseid. 1968. Influence of dietary protein levels and hydrocortisone administration on the branched chain amino acid transaminase activity in rat tissues. *J. Nutr.* 95:493-497.
- Moore, D. T., P. R. Ferket, P. E. Mozdziak. 2005. The effect of early nutrition on satellite cell dynamics in the young turkey. *Poult. Sci.* 84:748–756.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26^a ed. Page 783, São Paulo, Ed. Atheneu.
- Nascimento, G. R., A. E. Murakami, I. C. Ospina-Rojas, M. D. Vargas, R. G. Garcia. 2015. Valina digestível em dietas com baixo teor proteico para frangos de corte. *Cienc. Rural.* In press.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Nissen, S. L., and Abumrad, N. N. 1997. Nutritional role of the leucine metabolite β -hidroxi- β -metilbutirato. *Nutr. Biochem.* 8:300–311.
- Ostaszewski, P., S. Kostiuk, B. Balasinska, M. Jank, I. Papet, and F. Glomot. 2000. The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 84:1–8, 2000.
- Panton, L. B., J. A. Rathmacher, S. BAIER, and S. Nissen. 2000. Nutritional supplementation of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) during resistance training. *Nutrition.* 16:734–739.
- Peganova, S., and K. Eder. 2002. Studies on requirement and excess of isoleucine in laying hens. *Poult. Sci.* 81:1714–1721.
- Peganova, S., and K. Eder. 2003. Interactions of various supplies of isoleucine, valine, leucine and tryptophan on the performance of laying hens. *Poult. Sci.* 82:100-105.
- Platell, C., S. E. Kong, R. McCauley, J. C. Hall. 2000. Branched-chain amino acids. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15(7):706-17.
- Phornphutkul, C, K. Y. Wu, V. Auyeung, Q. Chen, P. A. Gruppuso. 2008. mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Dev. Dyn.* 237:702–712.
- Potença, A., A. E. Murakami, I. C. Ospina-Rojas. 2015. Relación valina:lisina digestible en la dieta de pollos de engorda. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 6(1):25-37.
- Proud, C. G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* 269:5338-5349.
- Randle, P. J., H. R. Fatania, K. S. Lau. 1984. Regulation of the mitochondrial branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex of animal tissues by reversible phosphorylation. *Mol. Asp. Cell Regul.* 3:1-26.
- Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poult. Sci.* 86:1478–1490.

- Richards, M. P., R. W. Rosebrough, C. N. Coon, J. P. Mcmurtry. 2010. Feed intake regulation for the female broiler breeder: In theory and in practice. *J. Appl. Poult. Res.* 19:182-193.
- Rogero, M. M., J. Tirapegui. 2008. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44:563-575.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. de Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Brazilian tables for poultry and swine: feed composition and nutritional requirements. 3rd ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- Schuldt, S., P. Carter, and T. Welbourne. 1999. Glutamate transport asymmetry and metabolism in the functioning kidney. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 277:E439–E446.
- Shimomura, Y., M. Obayashi, T. Murakami, R. A. Harris. 2001. Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 4(5):419-23.
- Shimomura, Y., Harris, R.A. 2006. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. *J. Nutr.* 136:232S–233S.
- Shinnick, F. L., A. E. Harper. 1977. Effects of branched-chain amino acid antagonism in the rat on tissue amino acid and keto acid concentrations. *J Nutr.* 107(5):887-95.
- Shiota, T., M. Yagi, M. Walser. 1989. Utilization for protein synthesis in individual rat organs of extracellular 2-ketoisocaproate relative to utilization of extracellular leucine. *Metabolism.* 38:612–618.
- Smith, T. K., and R. E. Austic. 1978. The branched-chain amino acid antagonism in chicks. *J. Nutr.* 108:1180–1191.
- Smith, Q. R., S. Momma, M. Aoyagi, and S. I. Rapoport. 1987. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 49:1651–1658.
- Smith, H. J., P. Mukerji, M. J. Tisdale. 2005. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res.* 65:277-83.
- Suryawan, A., R. A. Orellana, M. L. Fiorotto, and T. A. Davis. 2011. Leucine acts as a nutrient signal to stimulate protein synthesis in neonatal pigs. *J. Anim. Sci.* 89(7): 2004–2016.
- Suryawan, A., R. M. Torrazza, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, M. L. Fiorotto, S. W. El-Kadi, N. Srivastava, H. V. Nguyen, T. A. Davis. 2012. Enteral leucine supplementation increases protein synthesis in skeletal and cardiac muscles and visceral tissues of neonatal pigs through mTORC1-dependent pathways. *Pediatr. Res.* 71(401):324-31.
- Tavernari, F. C., G. R. Lelis, R. A. Vieira, H. S. Rostagno, L. F. Albino, A. R. Oliveira Neto. 2013. Valine needs in starting and growing Cobb (500) broilers. *Poult. Sci.* 92:151-157.
- Tesseraud, S., K. Bigot, and M. Taouis. 2003. Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-intensive QM7 myoblasts. *FEBS Letters.* 540:176–180.
- Thornton, S. A., A. Corzo, G. T. Pharr, W. A. Dozier, D. M. Miles III, M. T. Kidd. 2006. Valine requirements for immune and growth responses in broilers from 3 to 6 weeks of age. *Br. Poult. Sci.* 47, 190–199.
- Torrazza R. M., A. Suryawan, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, J. W. Frank, H. V. Nguyen, M. L. Fiorotto, S. El-Kadi, T. A. Davis. 2010. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in

- neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *J. Nutr.* 140:2145–52.
- Ueda, H., S. Yabuta, H. Yokota, and I. Takashi. 1981. Involvement of feed intake and feed utilization in the growth retardation of chicks given the excessive amounts of leucine, lysine phenylalanine or methionine. *Nutr. Rep. Int.* 24: 135-144.
- Vianna, D., G. F. R. Teodoro, F. L. Torres-Leal, J. Tirapegui. 2010. Protein synthesis regulation by leucine. *Braz. J. Pharm. Sci.* 46:29-36.
- Wiltafsky, M. K., M. W. Pfaffl, F. X. Roth. 2010. The effects of branched-chain amino acid interactions on growth performance, blood metabolites, enzyme kinetics and transcriptomics in weaned pigs. *Br. J. Nutr.* 103(7):964-76.
- Wu, G. 2013. Degradation of Amino acids. Pages 118-122 in *Amino acids. Biochemistry and Nutrition*. Taylor & Francis Group, London, New York.
- Yu, J. C., Z. M. Jiang, D. M. Li. 1999. Glutamine: a precursor of glutathione and its effect on liver. *World J. Gastroenterol.* 5:143-146.
- Yudkoff, M., Y. Daikhin, I. Nissim, O. Horyn, B. Luhovyy, A. Lazarow, I. Nissim. 2005. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J Nutr.* 135:1531S-8S.
- Zanchi, N. E., H. Nicastro, A. H. Lancha Jr. 2008. Potential antiproteolytic effects of L-Leucine: Observations of in vivo and in vitro studies. *Nutr. Metabolism.* 5:20.

II – OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se com este trabalho estudar as interações e determinar as exigências da leucina e valina em frangos de corte nas fases inicial (1-21 dias) e crescimento (21-42 dias).

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da suplementação de leucina e valina sobre o desempenho, concentrações séricas de amônia, ácido úrico, glicose, triglicerídeos, corpos cetônicos, albumina e proteínas totais nas principais fases de criação do frango de corte (Capítulo III e IV).
2. Estudar o efeito da leucina e valina sobre a expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E-4EBP1 e eEF2, e o diâmetro da fibra muscular do músculo *pectoralis major* de frangos de corte (Capítulo V).
3. Avaliar o efeito da suplementação da leucina e valina sobre as características ósseas de frangos de corte (Capítulo V).

III - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 1-21 dias de idade

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo estudar as exigências de leucina e valina digestíveis em dietas com baixa proteína, e seus efeitos no desempenho, variáveis séricas e composição da cama de frangos de corte na fase inicial (1-21 dias). Foram utilizados 1.500 frangos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress®, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5, composto de cinco níveis de leucina digestível (1,00; 1,24; 1,48; 1,72 e 1,96%) e cinco níveis de valina digestível (0,60; 0,75; 0,90; 1,05 e 1,20%), com três repetições de 20 aves por unidade experimental. Aos 21 dias, foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina para o consumo de ração e conversão alimentar. Houve efeito quadrático ($P < 0,01$) dos níveis de leucina e valina digestível para o ganho de peso, com ponto de máxima estimado nos níveis de 1,28 e 0,92%, respectivamente. A suplementação de leucina e valina não influenciou ($P > 0,05$) os níveis séricos de ácido úrico, triglicerídeos, β -hidroxibutirato, proteínas totais, e albumina das aves. Os níveis séricos de amônia aumentaram linearmente ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de leucina digestível na dieta. Por sua vez, a suplementação de valina reduziu ($P < 0,05$) as concentrações séricas de amônia. Houve efeito linear crescente ($P \leq 0,06$) e decrescente ($P < 0,05$) dos níveis de leucina e valina, respectivamente, para as concentrações séricas de glicose. Considerando que as exigências dos aminoácidos de cadeia ramificada são influenciadas pelo antagonismo existente entre estes, existe a necessidade de estudar as exigências de leucina, valina e isoleucina em conjunto e assim, estabelecer relações ideais entre estes aminoácidos. Baseado na conversão alimentar, a exigência de leucina e valina digestível é de 1,29 e 0,91%, respectivamente, para frangos de corte na fase inicial alimentados com dietas com baixa proteína. A interação entre a leucina e valina demonstrou influenciar o desempenho, mas não os parâmetros séricos e as características da cama de frangos de corte submetidos a dietas com menores níveis proteicos na fase inicial.

Palavras-chave: aminoácido de cadeia ramificada, amônia, corpo cetônico, desempenho

III – Requirements of digestible leucine and valine for broilers from 1 to 21 days of age

ABSTRACT - A study was conducted to evaluate the requirements of digestible leucine and valine in low-CP diets, and their effects on performance, serum parameters and litter characteristics of broiler chickens during the starter phase (1-21 days). A total of 1,500 1-day-old Cobb-Vantress® male broilers were distributed in a completely randomized experimental design in a 5x5 factorial arrangement with 25 treatments with three replicate pens of 20 birds each. Treatments consisted of five dietary levels of digestible leucine (1.00; 1.24; 1.48; 1.72 and 1.96 %) and five levels of digestible valine (0.60; 0.75; 0.90; 1.05 and 1.20 %). At 21 days, interactions ($P < 0.05$) were observed between dietary leucine and valine levels for feed intake and feed:gain ratio. There was a quadratic effect ($P < 0.01$) of digestible leucine and valine levels on BW gain, with an optimization level of 1.28 and 0.92%, respectively. Valine and leucine supplementation did not affect ($P > 0.05$) the serum concentrations of uric acid, triglycerides, β -hydroxybutyrate, total protein and albumin of the birds. Serum levels of ammonia increased linearly ($P < 0.05$) with increasing levels of digestible leucine. However, valine supplementation reduced ($P < 0.05$) serum ammonia concentrations. Serum levels of glucose increased and decreased linearly ($P < 0.05$) with increasing levels of digestible leucine and valine, respectively. Considering that the requirements of the branched chain amino acids are influenced by the interactions among these, there is a need to study the requirements for leucine, isoleucine and valine together and thus to establish optimal relationships among these amino acids. Based on feed:gain ratio, digestible leucine and valine requirements in low-CP diets for male broilers in the starter phase were estimated in 1.29 and 0.91%, respectively. Leucine and valine interaction influence the broiler performance, but do not influence the serum β -hydroxybutyrate and the litter characteristics of broiler chickens fed low-CP diets during the starter period.

Key words: ammonia, branched chain amino acid, ketone body, performance

INTRODUÇÃO

A leucina e valina são considerados aminoácidos essenciais necessários para manutenção e crescimento tecidual, pertencentes ao grupo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), juntamente com a isoleucina.

Vários ingredientes tradicionalmente utilizados na dieta de frangos de corte contêm altos teores de leucina. No endosperma do grão de milho predominam as zeínas, proteínas simples que têm reduzido valor biológico devido a seu alto teor de leucina e baixo de lisina (Wilson, 1987). A proteína do milho é desproporcionalmente elevada em leucina em relação à valina e isoleucina, contendo valores de 1,01 e 0,40 e 0,29%, respectivamente (Rostagno et al., 2011).

Elevado conteúdo dietético de leucina aumenta a necessidade de níveis ideais de valina e isoleucina na dieta (D'Mello & Lewis, 1970), uma vez que este aminoácido estimula a desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKD), complexo enzimático chave envolvido na desaminação oxidativa dos três BCAA (Brosnan & Brosnan, 2006). Deste modo, o aumento da inclusão de leucina conduz a maior oxidação de valina e isoleucina diminuindo as concentrações séricas destes aminoácidos.

Apesar da literatura ser extensa sobre a utilização da leucina nas dietas de frangos de corte (D'Mello & Lewis, 1970; Boldizar et al., 1973; Smith & Austic, 1978; Farran & Thomas, 1990; Farran et al., 2003), os trabalhos são relativamente antigos e a maioria destas pesquisas foram direcionadas ao estudo do antagonismo da leucina com os outros BCAA (D'Mello & Lewis, 1970; Smith & Austic, 1978; Farran et al., 2003), resultando na formulação de dietas experimentais com níveis extremadamente altos de leucina, o que resultou, na maioria das ocasiões, em redução do desempenho dos animais, situação mais evidente em dietas com baixo conteúdo de PB (Boldizar et al., 1973; Smith & Austic, 1978).

Por outro lado, os pesquisadores tem-se centrado em estudar, principalmente as exigências dos outros dois BCAA (valina e isoleucina), outorgando-lhe pouca importância à leucina, não só pela dificuldade de induzir uma deficiência drástica deste aminoácido na dieta devido ao seu alto teor nos ingredientes, mas também pela maior importância dada aos aminoácidos valina e isoleucina por serem considerados os possíveis aminoácidos limitantes, após a treonina, em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte (Baker et al., 2002).

Não obstante, não foi evidenciado redução no crescimento de ratos (Imamura et al., 2013), suínos (Edmonds & Baker, 1987) e frangos de corte (Waldroup et al., 2002) alimentados com altos níveis de leucina em dietas ricas em proteína. No entanto, D'Mello & Lewis (1970) encontraram redução no desempenho de aves alimentadas com níveis totais de leucina de 2,9% em dietas com baixo teor de PB (20%). Deste modo, é possível presumir que as aves podem ser mais susceptíveis a níveis elevados de leucina em dietas com baixo conteúdo proteico.

As exigências dos BCAA parecem ser influenciadas pelo antagonismo existente entre estes. Mesmo assim, múltiplas pesquisas determinaram as exigências de valina isoladamente sem considerar o nível de leucina na dieta e as possíveis interações entre estes aminoácidos, fatores importantes a serem ponderados, principalmente, em dietas com baixo teor proteico, as quais podem acentuar o efeito antagônico dos BCAA.

Na fase final do metabolismo dos BCAA, estes aminoácidos são oxidados por vias metabólicas diferentes, resultando assim, em produtos finais distintos. A leucina é cetogênica ao ser metabolizada em acetil-CoA e acetoacetato, enquanto que a valina é glicogênica, uma vez que seu esqueleto de carbono é convertido em succinil-CoA, intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Brosnan & Brosnan, 2006). Assim, a suplementação de leucina e valina, além de influenciar o desempenho dos frangos de corte, poderia também afetar as concentrações de importantes compostos sanguíneos. Igualmente, a suplementação da leucina poderia aumentar os níveis séricos de amônia e ácido úrico das aves e conseqüentemente, a emissão de amônia da cama, possivelmente, por aumentar o catabolismo da valina e isoleucina. No entanto, esta afirmação precisa ser corroborada.

Com base nessas afirmações, o objetivo deste estudo foi estudar as exigências de leucina e valina digestíveis em dietas com baixa proteína e, seus efeitos no desempenho, níveis séricos e composição da cama de frangos de corte na fase inicial (1-21 dias).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá - UEM. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 107/2012).

Foram utilizados 1.500 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress® distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x5, totalizando 25 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de leucina digestível (1,00; 1,24; 1,48; 1,72 e 1,96%) e cinco níveis de valina digestível (0,60; 0,75; 0,90; 1,05 e 1,20%).

As aves foram alojadas em um galpão climatizado com ventilação de pressão negativa e placa evaporativa. As aves foram criadas em boxes de 2,0 m². Empregou-se um programa de iluminação contínua durante a primeira semana e de 23 horas de luz diárias, até o final do período. O material utilizado como cama foi maravalha de primeiro uso. Água e ração foram fornecidos à vontade.

Foram analisados o conteúdo de aminoácidos totais (método 994,12) e proteína (método 968,06) de todos os ingredientes (milho, farinha de carne e ossos, farelo de soja e farelo de trigo) antes da formulação das rações e de amostras representativas das dietas experimentais, de acordo com os procedimentos do AOAC (2006). Os valores de aminoácidos digestíveis dos ingredientes foram calculados utilizando-se os coeficientes de digestibilidade de Rostagno et al. (2011) e o conteúdo analisado de aminoácidos totais.

A ração basal com redução dos níveis proteicos foi formulada de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais para frangos de corte machos de desempenho médio propostas por Rostagno et al. (2011), exceto para a leucina e valina digestível (Tabela 1). As demais rações experimentais foram obtidas mediante a suplementação de leucina e valina na ração basal, em substituição ao inerte.

A deficiência de leucina digestível foi obtida com a redução do nível de proteína da dieta. Nesse contexto, a farinha de carne e ossos e o farelo de trigo foram utilizados na formulação das rações por apresentarem menor teor de leucina digestível em relação a seu conteúdo de proteína (relação leucina/proteína - Leu/PB), quando comparado com outros ingredientes. Deste modo, evitando-se reduções excessivas da proteína, ao mesmo tempo que permite obter níveis deficientes de leucina na dieta.

Os frangos e as rações foram devidamente pesados aos 1, 7, 14 e 21 dias de idade, para avaliação do desempenho (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar). A mortalidade das aves foi registrada diariamente, assim como, suas possíveis causas foram determinadas por necropsia, e ainda as aves foram pesadas, para ajustar o consumo de ração e a conversão alimentar.

Tabela 1. Composição percentual e calculada da dieta basal (1 – 21 dias)

Item	Dieta basal
Ingrediente, %	
Milho	65,08
Farelo de soja 45%	8,95
Farelo de trigo	7,00
Farinha de carne e osso 49%	5,55
Óleo de soja	2,69
Fosfato Bicálcico	0,23
Calcário	0,24
Sal comum	0,40
Cloreto de potássio	0,24
Supl, Min – Vit ¹	0,40
Inerte (Caulim) ²	2,00
L-Glu 99,4%	3,50
DL-Met 99%	0,54
L-Lys HCl 78,5%	0,96
L-Thr 98%	0,41
L-Val 98%	0,09
L-Ile 98%	0,44
L-Arg 99%	0,59
L-Trp 98%	0,11
Gly 97%	0,58
Composição calculada ³	
PB, %	18,50
EM, kcal/kg	2.975
Cálcio, %	0,87
Cloro, %	0,32
Fosforo disponível, %	0,43
Potássio, %	0,59
Sódio, %	0,22
Gly+Ser dig, %	1,83
Arg dig, %	1,34
Ile dig, %	0,83
Lys dig, %	1,24
Met+Cys dig, %	0,90
Thr dig, %	0,81
Trp dig, %	0,21
Leu dig, %	1,00
Val dig, %	0,60
Fibra bruta, %	2,26
Relação AEE:AANE	42:58
BED, mEq/kg	154

¹Suplemento vitamínico e mineral Inicial (Conteúdo por kg de ração): Vit. A (acetato de retinol), 2167 UI; Vit. D3 (colecalciferol), 1233 UI; Vit. E (acetato de dl- α -tocoferol), 3500 UI; Vit. K3 (menadiona dimetilpirimidinol), 1,7 mg; Vit. B1 (tiamina mononitrato), 1,6 mg; Vit. B12 (cianocobalamina), 16,7 μ g; riboflavina, 5,3 mg; piridoxina, 4 mg; niacina (niacinamida), 36 mg;

ácido pantotênico, 13 mg; ácido fólico, 0,8 mg; d-biotina, 0,1 mg; cloreto de colina, 270; BHT (hidroxitolueno butilado), 5,8 mg; Fe (ferro sulfato de mono-hidrato), 50 mg; Cu (sulfato de cobre penta-hidratado), 12 mg; I (iodato de cálcio), 0,9 mg; Zn (óxido de zinco), 50 mg; Mn (óxido de manganês), 60 mg; Se (Selenito de sódio), 0,2 mg; Co (sulfato de cobalto), 0,2 mg.

²Inerte (Caulim) – A adição de AA industriais foi em substituição ao inerte.

³Valores totais calculados e analisados (em parênteses): PB 18,50 (18,22); Leu 1,10 (1,14); Val 0,68 (0,71); Ile 0,92 (0,89); Lys 1,37 (1,32); Met+Cys 0,99 (0,95); Arg 1,39 (1,44).

Aos 21 dias de idade, foram colhidas amostras de sangue (2 ml /aves) da veia jugular de duas aves por unidade experimental, selecionadas com base no peso médio do box (média±5%). As amostras foram mantidas em gelo e centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos, sendo o soro armazenado a -80 °C até as análises. As amostras de soro foram descongeladas a 4 °C e, as concentrações séricas de triglicérides, ácido úrico, albumina, proteínas totais e glicose foram analisadas mediante o uso de kits comerciais (Gold Analisa Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), de acordo com os procedimentos descritos por Tietz (1986). A amônia sérica foi determinada conforme descrito por Ishihard et al. (1972), procedimento no qual a amônia reage com o 2-cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela enzima glutamato+desidrogenase, ocorrendo oxidação do NADH a NAD. As concentrações séricas de β-hidroxibutirato (corpos cetônicos) foram analisadas mediante ensaio colorimétrico (EnzyChrom™, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) como descrito por Hultman (1974).

Aos 21 dias de idade, foram colhidas amostras de cama, em três pontos por box, mantendo uma distância mínima de 10 cm de bebedouros e comedouros, procurando-se retirar um volume em torno de 500 gramas de amostra. Posteriormente, essas três amostras foram homogeneizadas e utilizadas imediatamente para determinar a quantidade de amônia liberada pela cama conforme a metodologia de Hernandez & Cazetta (2001), e utilizadas para analisar a MS e o teor de nitrogênio (AOAC, 2006).

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do software SAS (SAS Institute, 2009). Foram avaliados o termo linear e quadrático das variáveis independentes e a interação entre essas variáveis. Os termos que não foram significativos ($P > 0,05$) foram eliminados do modelo final e, em seguida, o teste da razão de verossimilhança foi utilizado para testar a significância entre o modelo completo e o modelo reduzido e, deste modo, determinar o modelo mais adequado. Posteriormente, foi gerada uma equação polinomial de segundo grau como descrito por Box et al. (1987):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon,$$

Onde Y é a variável resposta, X_i representa as variáveis de entrada (níveis de leucina e valina digestíveis), β_0 é a constante, β_i é o coeficiente do parâmetro linear, β_{ii} é o coeficiente do parâmetro quadrático, β_{ij} é o coeficiente da interação e ε o erro residual. O ponto estacionário (ponto de mínima ou máxima de resposta) da equação de segundo grau foi calculado tomando-se a primeira derivada da equação quadrática e igualando-a a zero, como segue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2,$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \beta_1 + 2\beta_{11} X_1 + \beta_{12} X_2 = 0,$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = \beta_2 + 2\beta_{22} X_2 + \beta_{12} X_1 = 0,$$

Em seguida, o sistema de equação foi resolvido para assim encontrar os valores de X_1 e X_2 . Quando as interações foram significativas, foram gerados gráficos tridimensionais de superfície resposta com seus respectivas curvas de contorno utilizando-se o Software StatSoft (2008). As exigências de leucina e valina digestível foram estabelecidas considerando-se o 95% de confiança do ponto de mínima ou máxima resposta. Todas as análises estatísticas foram baseadas em uma probabilidade de $P < 0,05$, salvo quando indicado o contrário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 21 dias de idade, foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para o consumo de ração (Tabela 2). De acordo com a equação ajustada ($CR = 644,15 + 644,446 * Leu - 320,313 * Leu^2 + 146,15 * Val - 221,447 * Val^2 + 223,008 * LeuVal$; $R^2 = 0,71$), o maior consumo de ração pode ser obtido nos níveis estimados de leucina e valina digestíveis de 1,29 e 0,96%, respectivamente.

Altos níveis de leucina digestível em dietas com baixo nível proteico parecem diminuir o consumo de ração das aves (Figura 1), sendo considerado o principal efeito antagônico originado pelo excesso de leucina na dieta (Ueda et al., 1981).

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis durante a fase de 1-21 dias de idade

Tratamento	Consumo de ração (g)	Ganho de peso (g)	Conversão alimentar (g/g)
Leucina (%)			
1,00	1097,09	779,56	1,410
1,24	1162,70	838,08	1,389
1,48	1157,62	827,46	1,401
1,72	1042,14	757,33	1,378
1,96	1033,80	723,35	1,432
Valina (%)			
0,60	1078,66	732,90	1,472
0,75	1093,15	791,60	1,382
0,90	1103,47	811,47	1,360
1,05	1105,39	804,63	1,373
1,20	1112,67	785,17	1,423
SEM	8,27	6,55	0,01
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----		
Leu linear	0,001	0,001	0,48
Leu quadrática	0,001	0,001	0,03
Val linear	0,05	0,01	0,02
Val quadrática	0,06	0,001	0,001
Leu x Val	0,01	0,46	0,001

SEM= Erro padrão da média

Os níveis de leucina e valina interagiram positivamente sobre o consumo de ração ($+223,008 \cdot \text{LeuVal}$), o que permite sugerir que a adição dietética de valina pode reduzir parcialmente o efeito negativo da leucina sobre a ingestão de alimento.

Corzo et al. (2008) estimaram níveis de valina digestível de 0,89% para maximizar o consumo de ração de frangos de corte na fase de 1 a 14 dias. Apesar de que Corzo et al. (2008) utilizaram pintos de menor idade, aves com maior taxa de deposição proteica e, portanto, maior necessidade de aminoácidos, a exigência estimada por eles foi inferior à determinada no presente estudo (0,96%), possivelmente, devido a que estes autores não utilizaram dietas com níveis crescentes de leucina, resultando em dietas sem altos teores

deste aminoácido. Porém, Corzo et al. (2008) não indicaram o nível de leucina utilizado em suas dietas experimentais, como também não mencionado em outros estudos (Thornton et al., 2006; Corzo et al., 2007).

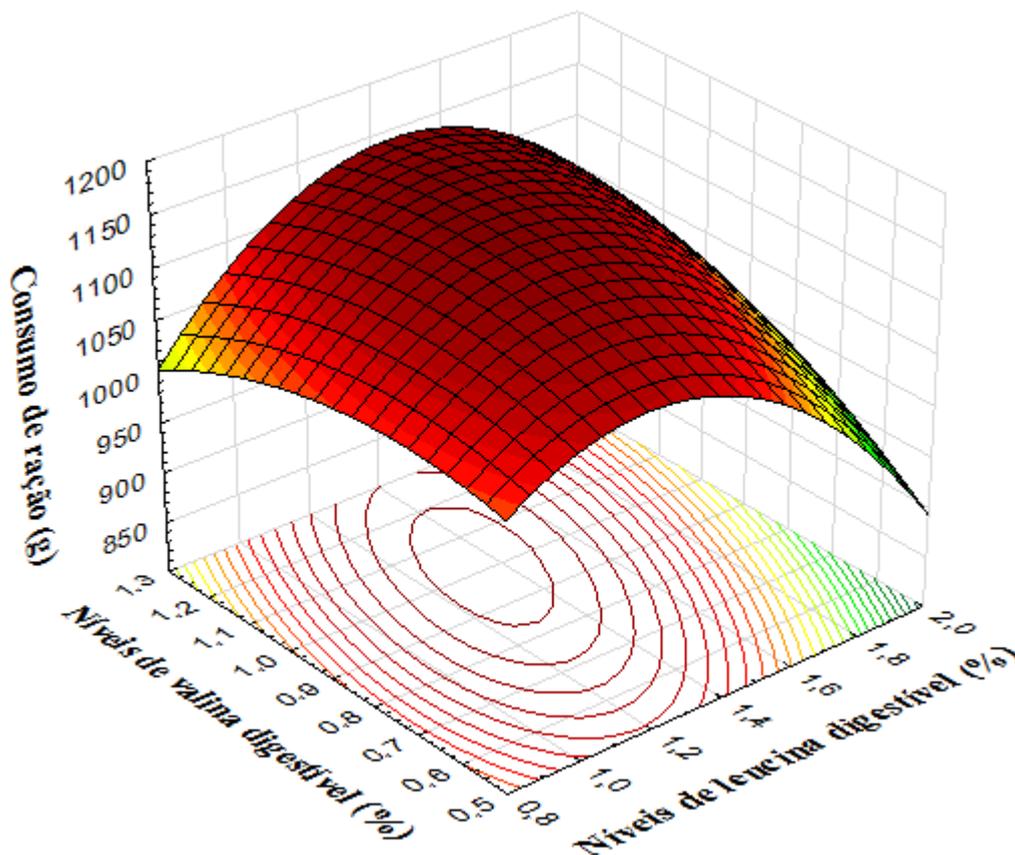


Figura 1. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre o consumo de ração de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 1 - 21 dias de idade.

Elevado conteúdo dietético de leucina aumenta os níveis ideais de valina e isoleucina, especialmente quando estes dois últimos aminoácidos estão em níveis marginais na dieta (D'Mello & Lewis, 1970). A alta ingestão de leucina estimula a desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKD), complexo enzimático envolvido na degradação dos três BCAA (Brosnan & Brosnan, 2006). Deste modo, o aumento de inclusão de leucina conduz à maior oxidação de valina e isoleucina, diminuindo as concentrações plasmáticas destes aminoácidos, afirmação que pode explicar a alta exigência de valina digestível estimada para o consumo de ração no presente estudo. Parece ser que quanto maior a inclusão de leucina em dietas com baixa PB maior será a necessidade de valina nas aves para otimizar o consumo de ração.

A redução do “pool” sanguíneo de valina e isoleucina pode ser um dos fatores responsáveis da menor ingestão de alimentos em animais alimentados com altos níveis de leucina. Esta afirmação é suportada pelos resultados obtidos neste estudo, onde a suplementação de valina permitiu melhorar o consumo de ração das aves. Do mesmo modo, dietas deficientes em valina demonstraram reduzir o consumo de ração em ratos (Goto et al., 2010) e suínos (Wiltafsk et al., 2010), sendo este efeito mais pronunciado quando estas dietas contêm excesso de leucina (Gloaguen et al., 2011).

Não foi observada ($P > 0,05$) interação entre os níveis de leucina e valina digestíveis para o ganho de peso. Entretanto, o ganho de peso apresentou efeito quadrático ($P < 0,01$) em função dos níveis de leucina e valina digestíveis ($GP = -239,983 + 816,96*Leu - 303,19*Leu^2 + 1124,332*Val - 581,086*Val^2$; $R^2 = 0,74$), com ponto de máxima estimado nos níveis de 1,28 e 0,92%, respectivamente.

Foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para a conversão alimentar, conforme a equação ajustada ($CA = 3,009 - 0,751*Leu + 0,145*Leu^2 - 2,424*Val + 1,001*Val^2 + 0,372*LeuVal$; $R^2 = 0,87$), é possível otimizar a conversão alimentar de aves alimentadas com dietas com menor nível de proteína, na fase inicial, com a utilização de níveis dietéticos de leucina e valina de 1,29 e 0,91%, respectivamente (Figura 2), representando uma relação de valina:leucina digestível de 0,71.

Relações semelhantes foram estimadas a partir das recomendações nutricionais de Baker & Han (1994) e Rostagno et al. (2011), com valores de 0,71 e 0,72, respectivamente. Relações maiores de valina:leucina, de 0,75 e 0,78 foram estimadas com base no NRC (1990) e Farran & Thomas (1990).

D’Mello (1974), Woodham & Deans (1975), Farran & Thomas (1990) e Baker & Han (1994) estimaram exigências de leucina inferiores, com valores totais de 1,10; 1,05; 1,16 e 1,20%, respectivamente. Contudo, alguns destes estudos determinaram estas exigências utilizando rações com dietas purificadas ou semi-purificadas (D’Mello, 1974; Farran & Thomas, 1990; Baker & Han, 1994), dietas que podem reduzir o consumo de ração e o crescimento das aves quando comparado com dietas formuladas com ingredientes convencionais (Wheeler & Latshaw, 1981; Ruiz et al., 1990).

Do mesmo modo, o NRC (1994) recomenda um nível de leucina inferior, sendo este de 1,20% de leucina total para frangos de corte na fase de 1-21 dias de idade. No entanto, o NRC (1994) pode estar subestimando a exigência de leucina para as linhagens de frangos de corte modernas, pois os experimentos utilizados pelo NRC (1994) para

determinar esta exigência foram realizados há aproximadamente três décadas (Almquist, 1947; D'Mello, 1974; Woodham & Deans, 1975), a partir de pesquisas que ainda formulavam com base em aminoácidos totais, e não digestíveis. Com o aumento da deposição de proteína na carne devido à contínua seleção genética dos frangos de corte com o decorrer dos anos, houve um incremento também na exigência de todos os nutrientes, especialmente dos aminoácidos.

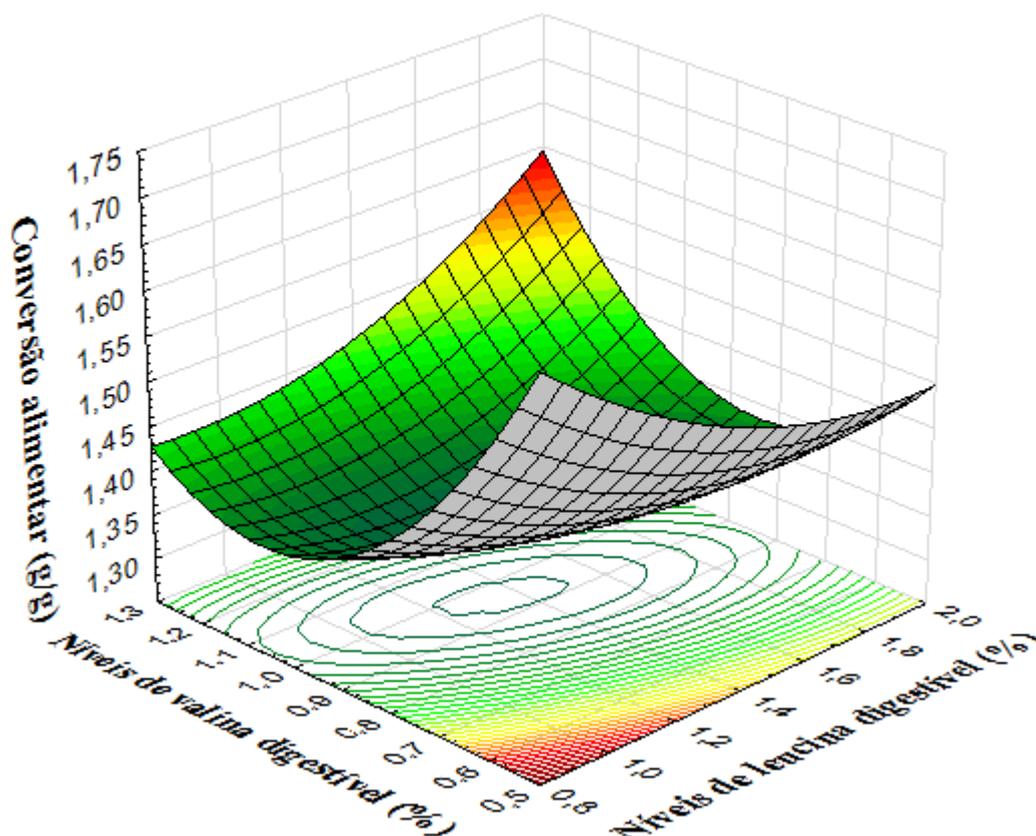


Figura 2. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre a conversão alimentar de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 1 - 21 dias de idade.

Embora a valina seja o quarto aminoácido limitante em dietas vegetais para frangos de corte, ainda existem algumas discrepâncias sobre suas exigências na literatura. Neste sentido Baker et al. (2002), Tavernari et al. (2013) e Nascimento et al. (2015) utilizando frangos de corte em uma mesma fase (8-21 dias), estimaram exigências de valina digestíveis diferentes, de 0,74, 0,79 e 0,91%, respectivamente.

Sabe-se que diferenças de linhagem, sexo, idade das aves e tipos de ingredientes podem influenciar o nível ótimo de valina obtido nos diferentes estudos (Tavernari et al., 2013). Cabe ressaltar que o teor de leucina na dieta pode ser o principal fator de variação nestas estimativas, visto que este aminoácido influencia a eficiência de utilização da

valina nas aves (Allen & Baker, 1972), demonstrando que as necessidades nutricionais destes aminoácidos são afetadas por suas interações, como encontrado neste estudo ($CA = 3,01 - 0,751*Leu + 0,145*Leu^2 - 2,424*Val + 1,001*Val^2 + 0,372*LeuVal$; $R = 0,87$). Por conseguinte, é necessário considerar o teor de leucina dietética para estimar o nível ideal de valina na dieta de frangos de corte (relação valina:leucina), principalmente em dietas com baixa PB, porém, poucos estudos ponderaram este importante fator (D'Mello, 1974; Woodham & Deans, 1975; Farran & Thomas, 1990).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre as concentrações séricas de triglicerídeos, β -hidroxibutirato (corpo cetônico), amônia, ácido úrico, albumina, proteínas totais e glicose (Tabela 3).

A leucina participa da cetogênese hepática (Kulaylat et al., 1988), pois o esqueleto de carbono da leucina é metabolizado em acetil-CoA e acetoacetato, sendo estes compostos intermediários utilizados na síntese de ácidos graxos e corpos cetônicos (Brosnan & Brosnan, 2006). Os corpos cetônicos podem atuar como um sinal inibitório da ingestão de alimento no sistema nervoso central e periférico das aves (Sashihara, 2001).

Embora a leucina seja um aminoácido exclusivamente cetogênico, a suplementação de leucina não influenciou ($P > 0,05$) os níveis séricos de triglicerídeos e de β -hidroxibutirato. Igualmente, os níveis de valina não afetaram ($P > 0,05$) estas variáveis. Este resultado permite descartar que a causa da redução do consumo de ração das aves suplementadas com excesso de leucina seja a cetogênese.

Do mesmo modo, Farran et al. (2003) não encontraram alterações nos níveis do β -hidroxibutirato de aves que receberam dietas com 3% de leucina. O aumento dos corpos cetônicos poderia ser uma consequência e, não a causa, da menor ingestão de alimento, uma vez que os níveis plasmáticos destes compostos aumentam conforme aumenta o grau de restrição alimentar (McCormick et al., 1979), sendo os corpos cetônicos utilizados como um substrato alternativo de energia. No entanto, no presente estudo, a redução do consumo de ração, possivelmente, não foi o suficientemente drástica ou duradoura para induzir mudanças nos níveis dos corpos cetônicos das aves.

Tabela 3. Níveis séricos de triglicerídeos (TG), β -hidroxibutirato (β -OHB), amônia, ácido úrico, albumina, proteínas totais (PT) e glicose de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 dias de idade

Tratamento	TG (mg/dL)	β -OHB (mg/dL)	Amônia (mmol/L)	Ácido Úrico (mg/dL)	Albumina (g/dL)	PT (g/dL)	Glicose (mg/dL)
Leucina (%)							
1,00	118,52	6,46	4,97	5,59	2,10	1,94	277,84
1,24	115,33	7,04	5,29	5,32	1,94	2,02	269,76
1,48	119,96	5,82	5,86	5,28	2,02	2,01	266,75
1,72	117,31	6,28	5,98	5,80	2,09	2,07	261,72
1,96	114,59	6,69	5,73	5,29	1,96	2,02	261,89
Valina (%)							
0,60	113,66	6,23	6,11	5,48	2,01	2,05	262,24
0,75	124,99	6,32	5,45	4,77	1,97	1,97	258,50
0,90	110,90	7,19	5,36	5,61	2,00	2,11	267,86
1,05	102,17	6,24	5,79	5,75	2,21	2,09	270,33
1,20	134,00	6,31	5,11	5,66	1,92	1,84	279,02
SEM	3,06	0,17	0,12	0,13	0,04	0,05	2,99
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----						
Leu linear	0,78	0,81	0,01	0,89	0,68	0,49	0,06
Leu quadrática	0,80	0,36	0,10	0,94	0,86	0,57	0,55
Val linear	0,41	0,95	0,04	0,11	0,87	0,32	0,03
Val quadrática	0,09	0,20	0,61	0,58	0,34	0,16	0,46
Leu x Val	0,10	0,55	0,15	0,28	0,60	0,31	0,47

SEM= Erro padrão da média

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) dos níveis de leucina digestíveis para os níveis séricos de amônia ($SA = - 8,854 + 8,338*Leu$; $R^2 = 0,95$) aos 21 dias de idade, indicando um desbalanço aminoacídico na corrente sanguínea conforme aumenta a suplementação do aminoácido, possivelmente, por aumentar o catabolismo da valina e isoleucina. No entanto, a suplementação de valina reduziu ($P < 0,05$) as concentrações séricas de amônia. Estas respostas sobre os níveis séricos de amônia corroboram que altos níveis de leucina antagonizam a utilização da valina, efeito adverso que pode ser atenuado com a suplementação dietética do aminoácido.

Embora a suplementação de BCAA estimule a síntese de proteínas nos tecidos de mamíferos (Suryawan et al., 2012), no presente estudo, os níveis de leucina e valina não

influenciaram as concentrações séricas de albumina e proteínas totais. Contudo, este resultado não permite descartar o papel dos BCAA sobre a síntese proteica celular das aves, sendo necessária a utilização de análises mais específicas para estudar esse assunto.

Os níveis de leucina e valina resultaram em respostas diferentes sobre os níveis séricos de glicose nos frangos de corte aos 21 dias de idade. Enquanto que a suplementação de leucina reduziu ($P \leq 0,06$) esta variável, a adição de valina aumentou ($P < 0,05$).

Resultados semelhantes foram reportados por Nishitani et al. (2005) em ratos suplementados com BCAA. Sabe-se que a valina é um aminoácido glicogênico, uma vez que seu esqueleto de carbono é metabolizado em succinil-CoA, intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o qual pode ser convertido posteriormente em glicose ou glicogênio (Brosnan & Letto, 1991), aumentando assim, possivelmente, as concentrações séricas de glicose das aves. Por outro lado, a leucina estimula de forma aguda a secreção de insulina nas células β pancreáticas (Yang et al., 2010), promovendo consequentemente a captação de glicose no músculo esquelético (Nishitani et al., 2002), motivo pelo qual a adição de leucina pode ter diminuído as concentrações séricas de glicose no presente estudo.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre a emissão de amônia, umidade e nitrogênio da cama (Tabela 4). Apesar das concentrações séricas de amônia terem sido influenciadas pelos níveis de leucina digestíveis, a emissão de amônia da cama não foi afetada ($P > 0,05$) pelas dietas experimentais. Igualmente, o teor de nitrogênio e umidade da cama não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos tratamentos.

No presente estudo, evidenciou-se que o principal efeito negativo do excesso de leucina na dieta foi a redução do consumo de ração das aves, resposta devida, em parte, pelo aumento nas concentrações séricas de amônia. Pois, a suplementação de leucina em altos níveis pode ter induzido um desbalanço no perfil de aminoácidos na corrente sanguínea das aves ao aumentar o catabolismo da valina e isoleucina. Contudo, não há dúvida que a diminuição da PB favoreceu esse processo.

Tabela 4. Emissão de amônia, umidade e teor de nitrogênio da cama de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 dias de idade

Tratamento	Emissão de amônia (mg NH ₃ /100g MS dia)	Umidade (%)	Nitrogênio (g/dL)
Leucina (%)			
1,00	2,69	17,88	3,01
1,24	2,56	18,50	3,09
1,48	2,55	18,33	2,92
1,72	2,81	17,91	3,42
1,96	2,70	18,02	3,45
Valina (%)			
0,60	2,58	18,12	3,27
0,75	2,64	18,57	3,37
0,90	2,60	17,84	3,18
1,05	2,72	17,92	2,98
1,20	2,77	18,19	3,09
SEM	0,07	0,16	0,10
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----		
Leu linear	0,11	0,79	0,09
Leu quadrática	0,60	0,35	0,49
Val linear	0,18	0,65	0,30
Val quadrática	0,81	0,74	0,99
Leu x Val	0,29	0,76	0,36

SEM= Erro padrão da média

Dietas com baixa proteína são formuladas para atender as exigências mínimas de aminoácidos, portanto, podem conter níveis menores de valina e isoleucina, o que pode acentuar o efeito antagônico da leucina. Igualmente, dietas com menor nível proteico requerem a suplementação de um maior número de aminoácidos industriais. Sabe-se que os aminoácidos industriais podem entrar na corrente sanguínea mais rapidamente que fontes de proteína intacta, fator que pode ter acentuado o desbalanço aminoacídico, aumentando assim, a produção de amônia.

A suplementação de valina permitiu melhorar o consumo de ração das aves ao reduzir os níveis séricos de amônia, o que conseqüentemente aumenta sua exigência. Portanto, o estudo da exigência de valina e leucina simultaneamente é de fundamental importância para o estabelecimento de níveis adequados destes aminoácidos na dieta.

Na tentativa de conseguir minimizar as discrepâncias nas estimativas de valina, ainda presentes na literatura, torna-se necessário validar a exigência de leucina nas diferentes fases de criação dos frangos de corte, as quais podem estar subestimadas às necessidades dos frangos de corte modernos, permitindo assim, estabelecer relações ideais entre estes aminoácidos (relação valina:leucina digestível), pois é evidente suas inter-relações.

CONCLUSÃO

Baseado na conversão alimentar, a exigência de leucina e valina digestível em dietas com baixa proteína é de 1,29 e 0,91%, respectivamente, para frangos de corte na fase inicial. A interação leucina-valina demonstrou influenciar o desempenho, mas não os valores séricos e as características da cama de frangos de corte submetidos a dietas com menor nível proteico na fase inicial.

REFERÊNCIAS

- Allan, N. K., and D. H. Baker. 1972. Quantitative efficacy of dietary isoleucine and valine for chick growth as influenced by variable quantities of excess dietary leucine. *Poult. Sci.* 51:1292-1298.
- Almquist, H. J. 1947. Evaluation of amino acid requirements by observations on the chick. *J. Nutr.* 34:543-563.
- AOAC. 2006. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Baker, D. H., and Y. Han. 1994. Ideal amino acid profile for chicks during the first three weeks posthatching. *Poult. Sci.* 73:1441-1447.
- Baker, D. H., A. B. Batal, T. M. Parr, N. R. Augspurger, and C. M. Parsons. 2002. Ideal ratio (relative to lysine) of tryptophan, threonine, isoleucine, and valine for chicks during the second and third weeks posthatch. *Poult. Sci.* 81:485-494.
- Blomstrand, E. 2006. A role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue. *J. Nutr.* 136:544S-547S.
- Boldizar, H. K., K. N. Boorman, and P. J. Buttery. 1973. The effect of excess leucine on valine catabolism in the chick. *Br. J. Nutr.* 30:501-510.
- Brosnan, M. E., and J. Letto. 1991. Interorgan metabolism of valine. *Amino Acids.* 1(1):29-35.
- Brosnan, J. T., and M. E. Brosnan. 2006. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J. Nutr.* 136:207S-211S.
- Choi, S., B. Disilvio, M. H. Fernstrom, and J. D. Fernstrom. 2013. Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. *Amino Acids.* 45(5):1133-1142.
- Corzo, A., M. T. Kidd, W. A. Dozier, and S. L. Vieira. 2007. Marginality and Needs of Dietary Valine for Broilers Fed Certain All-Vegetable Diets. *J. Appl. Poult. Res.* 16: 546-554.
- Corzo, A., W. A. Dozier III, and M. T. Kidd. 2008. Valine nutrient recommendations for Ross × Ross 308 broilers. *Poult. Sci.* 87:335-338.
- D'Mello, J. P. F., and D. Lewis. 1970. Amino acid interactions in chick nutrition. 2. Interrelationships between leucine, isoleucine, and valine. *Br. Poult. Sci.* 11:313-323.
- D'Mello, J. P. F. 1974. Plasma concentrations and dietary requirements of leucine, isoleucine and valine: Studies with the young chick. *J. Sci. Food Agric.* 25:187.
- Edmonds, M. S., and D. H. Baker. 1987. Amino acid excesses for young pigs: effects of excess methionine, tryptophan, threonine or leucine. *J. Anim. Sci.* 64:1664
- Farran, M. T., and O. P. Thomas. 1990. Dietary requirements of leucine, isoleucine, and valine in male broilers during the starter period. *Poult. Sci.* 69:757-762.
- Farran, M. T., E. K. Barbour, and V. M. Ashkarian. 2003. Effect of excess leucine in low protein diet on ketosis in 3-week-old male broiler chicks fed different levels of isoleucine and valine. *Anim. Feed Sci. Tech.* 103:171-176.
- Filipović, N., Z. Stojević, S. Milinković-Tur, B. Beer Ljubić, and M. Zdelar-Tuk. 2007. Changes in concentration and fractions of blood serum proteins of chickens during fattening. *Vet. Arhi.* 77:319-326.
- Gloaguen, M., N. Le Floc'h, L. Brossard, R. Barea, Y. Primot, E. Corrent, and J. van Milgen. 2011. Response of piglets to the valine content in diet in combination with the supply of other branched chain amino acids. *Animal.* 5:1734-1742.

- Goto, S., K. Nagao, M. Bannai, M. Takahashi, K. Nakahara, K. Kangawa, and N. Murakami. 2010. Anorexia in rats caused by a valine-deficient diet is not ameliorated by systemic ghrelin treatment. *Neuroscience*. 166:333–340.
- Henry, Y., B. Sève, Y. Colléaux, P. Ganier, C. Saligaut, and P. Jégo. 1992. Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma amino acids and hypothalamic serotonin. *J. Anim. Sci.* 70:1873-1887.
- Hultman, E. 1974. Ketone bodies in blood and urine in clinical biochemistry: principles and methods. In: Curtis, H.C., Roth, M. (Eds.), vol. II. Walter de Gruyter, Hawthorne 10532, NY.
- Hernandes, R., and J. O. Cazetta. 2001. A simple and accessible method to measure the ammonia produced from broiler litter. *Rev. Bras. Zootec.* 30:824-829.
- Imamura, W., R. Yoshimura, M. Takai, J. Yamamura, R. Kanamoto, and H. Kato. 2013. Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: A transcriptomic analysis to identify useful biomarkers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 59: 45-55.
- Ishihara, A., K. Kurahasi, and H. Uehara. 1972. Enzymatic determination of ammonia in blood and plasma. *Clin. Chim. Acta.* 41: 255–261.
- Kulaylat, M. N., M. Frexes-Steed, R. Geer, P. E. Williams, and N. N. Abumrad. 1988. The role of leucine in hepatic ketogenesis. *Surgery.* 103(3):351-360.
- McCormick, C. C., J. D. Garlich, and F. W. Edens. 1979. Fasting and diet affect the tolerance of young chickens exposed to acute heat stress. *J. Nutr.* 109(10):1797-1809.
- Nascimento, G. R., A. E. Murakami, I. C. Ospina-Rojas, M. D. Vargas, R. G. Garcia. 2015. Valina digestível em dietas com baixo teor proteico para frangos de corte. *Cienc. Rural.* In press.
- Nishitani, S., T. Matsumura, S. Fujitani, I. Sonaka, Y. Miura, and K. Yagasaki. 2002. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 693-696.
- Nishitani, S., K. Takehana, S. Fujitani, and I. Sonaka. 2005. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: G1292-1300.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. de Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. *Brazilian tables for poultry and swine: feed composition and nutritional requirements*. 3rd ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- Ruiz N., R. H. Harms, and S. B. Linda. 1990: Niacin requirement of broiler chickens fed a corn soybean meal diet from 1 to 21 days of age. *Poult. Sci.* 69(3):433-439.
- SAS Institute. 2009. *SAS Proprietary Software, Release 9.2*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sashihara, K., M. Miyamoto, A. Ohgushi, D. M. Denbow, and M. Furuse. 2001. Influence of ketone body and the inhibition of fatty acid oxidation on the food intake of the chick. *Br. Poult. Sci.* 42:405-408.
- Smith, T. K., Austic, R. E. 1978. The branched-chain amino acid antagonism in chicks. *J. Nutr.* 108:1180–1191.
- StatSoft. 2008. *Statistica Data Analysis Software System. Version 8.0*. StatSoft Inc., Tulsa, OK.
- Suryawan, A., H. V. Nguyen, R. D. Almonaci, T. A. Davis. 2012. Differential regulation of protein synthesis in skeletal muscle and liver of neonatal pigs by leucine through an mTORC1-dependent pathway. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 28:1-10.

- Tavernari, F. C., G. R. Lelis, R. A. Vieira, H. S. Rostagno, L. F. Albino, A. R. Oliveira Neto. 2013. Valine needs in starting and growing Cobb (500) broilers. *Poult. Sci.* 92:151-157.
- Thornton, S. A., A. Corzo, G. T. Pharr, W. A. Dozier, D. M. Miles III, M. T. Kidd. 2006. Valine requirements for immune and growth responses in broilers from 3 to 6 weeks of age. *Br. Poult. Sci.* 47, 190–199.
- Tietz, N. W. 1986. Fundamentals of clinical chemistry. Page 1,186 in *Clinical Chemistry*. WB Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Ueda, H., S. Yabuta, H. Yokota, and I. Tasaki. 1981. Involvement of feed intake and feed utilization in the growth retardation of chicks given the excessive amounts of leucine lysine phenylalanine or methionine. *Nutr. Rep. Int.* 24: 135-144.
- Waldroup, P. W., J. H. Kersey, and C.A. Fritts. 2002. Influence of branched chain amino acid balance in broiler diets. *Int. J. Poult. Sci.* 1: 136-144.
- Wheeler, K. B., and Latshaw, J. D. 1981. Sulfur amino acid requirements and interactions in broilers during two growth periods. *Poult. Sci.* 60:228-236.
- Wiltafsky, M. K., M. W. Pfaffl, and F. X. Roth. 2010. The effects of branched-chain amino acid interactions on growth performance, blood metabolites, enzyme kinetics and transcriptomics in weaned pigs. *Br. J. Nutr.* 103:964-976.
- Wilson, C. M. 1987. Proteins of the kernel. Pages 273–277 in *Corn Chemistry and Technology*. S. A. Watson and P. E. Ramstead, ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Woodham, A. A., and P. S. Deans. 1975. Amino acid requirements of growing chickens. *Br. Poult. Sci.* 16:269.
- Yang, J., Y. Chi, B. R. Burkhardt, Y. Guan, B. A. Wolf. 2010. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev.* 68:270-279.

IV - Exigências de leucina e valina digestíveis em frangos de corte na fase de 21-42 dias de idade

RESUMO - Este estudo foi realizado com o objetivo de estudar as exigências e interações entre a leucina e valina digestíveis em dietas com baixa proteína e, seus efeitos no desempenho, níveis séricos, características da cama e rendimento de carcaça de frangos de corte na fase de crescimento (21-42 dias). Foram utilizados 1.500 frangos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress®, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5, composto de cinco níveis de leucina digestível (1,00; 1,20; 1,40; 1,60 e 1,80%) e cinco níveis de valina digestível (0,52; 0,67; 0,82; 0,97 e 1,12%), com três repetições de 20 aves cada. Aos 42 dias de idade, foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para o consumo de ração e ganho de peso. Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) dos níveis de leucina e valina digestíveis para a conversão alimentar, com ponto de mínima estimado nos níveis de 1,19 e 0,86%, respectivamente. O aumento dos níveis de leucina na dieta reduziu linearmente ($P < 0,05$) as concentrações séricas de triglicérides e corpos cetônicos, porém aumentou os níveis séricos de amônia. A suplementação de valina resultou em redução quadrática ($P \leq 0,07$) das concentrações séricas de amônia. A leucina permitiu maximizar o rendimento do peito no nível de 1,13%, enquanto que a valina otimizou o rendimento da coxa no nível de 0,78%. O teor de gordura abdominal reduziu linearmente ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de leucina e valina na dieta. Baseado no desempenho, a exigência de leucina e valina digestível é de 1,19 e 0,86%, respectivamente, para frangos de corte na fase de crescimento em dietas com menor nível proteico. A suplementação de leucina e valina pode melhorar o metabolismo dos lipídeos, evitando o aumento da deposição de gordura de aves alimentadas com dietas com baixa proteína bruta na fase de crescimento.

Palavras-chave: aminoácido de cadeia ramificada, amônia, corpo cetônico, desempenho, gordura abdominal

IV – Requirements of digestible leucine and valine for broilers from 21 to 42 days of age

ABSTRACT - A study was conducted to evaluate the interactions and requirements of digestible leucine and valine in low-CP diets, and their effects on performance, serum parameters, litter characteristics, and carcass yield of broiler chickens during the grower phase (21-42 days). A total of 1,500 1-day-old Cobb-Vantress® male broilers were distributed in a completely randomized experimental design in a 5x5 factorial arrangement with 25 treatments with three replicate pens of 20 birds each. Treatments consisted of five dietary levels of digestible leucine (1.00; 1.20; 1.40; 1.60 and 1.80%) and five levels of digestible valine (0.52; 0.67; 0.82; 0.97 and 1.12%). At 42 days interactions ($P < 0.05$) were observed between dietary leucine and valine levels for feed intake and BW gain. There was a quadratic effect ($P < 0.01$) of digestible leucine and valine levels on feed:gain ratio, with an optimization level of 1.19 and 0.86%, respectively. Leucine supplementation decreased ($P < 0.05$) serum concentrations of triglycerides and ketone bodies, but increased levels of serum ammonia. Valine supplementation resulted in quadratic reduction ($P \leq 0.07$) of the serum ammonia. Breast yield was maximized at the level of 1.13% leucine, while the leg yield was optimized at the level of 0.78% valine. Abdominal fat decreased linearly ($P < 0.05$) with increasing dietary levels of digestible leucine and valine. Based on feed:gain ratio, digestible leucine and valine requirements in low-CP diets for male broilers in the grower phase were estimated between 1.19 and 0.86%, respectively. Valine and leucine supplementation may improve lipid metabolism and reduce fat deposition of birds fed low-CP diets during the grower phase.

Key words: abdominal fat, ammonia, branched chain amino acid, ketone body, performance

INTRODUÇÃO

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), leucina, isoleucina e valina, são os únicos aminoácidos metabolizados primariamente no músculo esquelético, servindo como precursores para a síntese de proteínas musculares e como fonte de energia para vários tecidos (Brosnan & Letto, 1991). Do mesmo modo, os BCAA são fonte importante de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina (Holecek, 2002), aminoácidos chaves na remoção do excesso de nitrogênio, o qual é transportado do músculo esquelético para o fígado e, utilizado na síntese de ácido úrico e de outros aminoácidos não essenciais (Stevens, 1996).

Os BCAA provenientes da dieta entram na circulação portal, mas normalmente desviam-se do fígado e prosseguem para os tecidos periféricos onde são retidos e catabolizados (Platell et al., 2000). As etapas iniciais do catabolismo do BCAA são iguais para os três aminoácidos, envolvendo a enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAT) e o complexo enzimático desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKD) (Brosnan & Brosnan, 2006).

Os três BCAA apresentam interações antagônicas entre si quando fornecidos em excesso (Harper et al., 1984), mas é a leucina que induz a efeitos mais notórios. Altos níveis de leucina na dieta aumentam as necessidades dietéticas dos outros dois BCAA em aves (Smith & Austic, 1978), suínos (Langer et al., 2000) e ratos (May et al., 1991), visto que favorecem a ativação do complexo BCKD (D'Mello & Lewis, 1970), portanto, o aumento da inclusão da leucina conduz à maior oxidação da valina e isoleucina, diminuindo as concentrações destes aminoácidos na corrente sanguínea e no tecido muscular (Harper et al., 1984).

O elevado custo dos ingredientes proteicos e a crescente pressão em reduzir a excreção de nitrogênio ao meio ambiente têm aumentado o interesse da indústria em utilizar dietas com baixo nível proteico. Entretanto, dietas com redução da PB, acima de três pontos percentuais, requerem a suplementação de um maior número de aminoácidos industriais, os quais podem entrar na corrente sanguínea mais rapidamente que fontes de proteína intacta, situação que pode ocasionar um desbalanço no perfil aminoacídico (Aftab et al., 2006) e, portanto, acentuar o efeito antagônico entre os BCAA.

Dietas para aves na fase de crescimento apresentam maior relação energia:proteína, conseqüentemente, a proporção do milho aumenta na dieta para atender a maior demanda energética. Sabe-se que a proteína do milho é desproporcionalmente elevada em leucina

em relação à valina e isoleucina (Rostagno et al., 2011), deste modo, o efeito antagônico entre os BCAA poderia ser mais pronunciado para aves nesta fase.

Considerando que os BCAA apresentam evidentes inter-relações e demonstraram influenciar o balanço do nitrogênio (Platell et al., 2000), torna-se importante estudar suas exigências e, deste modo, minimizar o desequilíbrio destes aminoácidos em dietas com baixa proteína, na busca de reduzir a excreção de nitrogênio e a emissão de amônia da cama dos frangos de corte, bem como, a poluição ambiental. Contudo, existem limitadas pesquisas direcionadas a estudar as exigências de valina e leucina, bem como suas interações para frangos de corte na fase de 21-42 dias.

Com base nessas afirmações, o objetivo deste estudo foi estudar as interações e exigências de leucina e valina digestível em dietas com baixa proteína e, seus efeitos no desempenho, níveis séricos, composição da cama e rendimentos de carcaça e cortes de frangos de corte na fase de crescimento (21-42 dias).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá - UEM. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 107/2012).

Foram utilizados 1.500 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb-Vantress® distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x5, totalizando 25 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de leucina digestível (1,00; 1,20; 1,40; 1,60 e 1,80%) e cinco níveis de valina digestível (0,52; 0,67; 0,82; 0,97 e 1,12%).

As aves foram alojadas em um galpão climatizado com ventilação de pressão negativa e placa evaporativa. As aves foram criadas em boxes de 2,0 m². Empregou-se um programa de iluminação contínua durante a primeira semana e de 23 horas de luz diárias, até o final do período. O material utilizado como cama foi maravalha de primeiro uso. Água e ração foram fornecidas à vontade.

O experimento foi conduzido durante a fase de 21-42 dias, portanto, as aves receberam uma dieta convencional a base de milho e farelo de soja até os 20 dias de idade e as dietas experimentais até os 42 dias.

Foram analisados o conteúdo de aminoácidos totais (método 994,12) e proteína bruta (método 968,06) de todos os ingredientes (milho, farinha de carne e ossos, farelo de soja e farelo de trigo) antes da formulação das rações e de amostras representativas das dietas experimentais, de acordo com os procedimentos descritos pelo AOAC (2006). Os valores de aminoácidos digestíveis dos ingredientes foram calculados utilizando-se os coeficientes de digestibilidade de Rostagno et al. (2011) e o conteúdo analisado de aminoácidos totais.

A ração basal com redução dos níveis proteicos foi formulada de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais para frangos de corte machos de desempenho médio propostas por Rostagno et al. (2011), exceto para a leucina e valina digestível (Tabela 1). As demais rações experimentais foram obtidas mediante a suplementação de leucina e valina na ração basal, em substituição ao inerte.

A deficiência de leucina digestível foi obtida com a redução do nível de proteína da dieta. Nesse contexto, a farinha de carne e ossos e o farelo de trigo foram utilizados na formulação das rações por apresentarem menor teor de leucina digestível em relação a seu conteúdo de proteína (relação leucina/proteína - Leu/PB), em comparação com outros ingredientes, deste modo, evitando-se reduções excessivas da proteína, ao mesmo tempo que pode ser obtido um nível deficiente de leucina na dieta. A relação Leu/PB na farinha de carne e ossos e no farelo de trigo é de 4,9 e 4,7%, respectivamente, enquanto que no milho e farelo de soja é de 11,4 e 7,1% (Rostagno et al., 2011).

Os frangos e as rações foram devidamente pesados aos 21, 28, 35 e 42 dias de idade, para avaliação do desempenho (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar). A mortalidade das aves foi registrada diariamente, assim como, suas possíveis causas foram determinadas por necropsia, e ainda as aves foram pesadas, para ajustar o consumo de ração e a conversão alimentar.

Tabela 1. Composição percentual e calculada da dieta basal (21 – 42 dias)

Item	Dieta basal
Ingrediente, %	
Milho	70,11
Farelo de soja 45%	9,73
Farelo de trigo	5,04
Farinha de carne e osso 49%	3,09
Óleo de soja	3,50
Fosfato bicálcico	0,35
Calcário	0,44
Sal comum	0,40
Cloreto de potássio	0,24
Supl, Min – Vit ¹	0,40
Inerte (Caulim) ²	1,60
L-Glu 99,4%	2,50
DL-Met 99%	0,41
L-Lys HCl 78,5%	0,74
L-Thr 98%	0,29
L-Val 98%	0,02
L-Ile 98%	0,32
L-Arg 99%	0,43
L-Trp 98%	0,09
Gly 97%	0,30
Composição calculada ³	
PB, %	16,00
EM, kcal/kg	3.125
Cálcio, %	0,69
Cloro, %	0,31
Fosforo disponível, %	0,32
Potássio, %	0,58
Sódio, %	0,20
Gly+Ser dig, %	1,40
Arg dig, %	1,13
Ile dig, %	0,71
Lys dig, %	1,04
Met+Cys dig, %	0,76
Thr dig, %	0,68
Trp dig, %	0,19
Leu dig, %	1,00
Val dig, %	0,52
Fibra bruta, %	2,27
Relação AEE:AANE	42:58
BED, mEq/kg	148

¹Suplemento vitamínico e mineral de crescimento (Conteúdo por kg de ração): Vit. A (acetato de retinol), 2148 UI; Vit. D3 (coleciferol), 1225 UI; Vit. E (acetato de dl- α -tocoferol), 3100 UI; Vit. K3 (menadiona dimetilpirimidinol), 1,5 mg; Vit. B1 (tiamina mononitrato), 1,6 mg; vit. B12 (cianocobalamina), 16,7 ug; riboflavina, 5,3 mg; piridoxina, 2,5 mg; niacina (niacinamida), 36

mg; ácido pantotênico, 13 mg; ácido fólico, 0,8 mg; d-biotina, 0,1 mg; cloreto de colina, 270; BHT (hidroxitolueno butilado), 5,8; Fe (ferro sulfato de mono-hidrato), 50 mg; Cu (cobre pentahidrato sulfato), 12 mg; I (iodato de cálcio), 0,9 mg; Zn (óxido de zinco), 50 mg; Mn (óxido manganoso), 60 mg; Se (Selenito de sódio), 0,2 mg; Co (sulfato de cobalto), 0,2 mg.

²Inerte (Caulim) – A adição de AA industriais foi em substituição ao inerte.

³Valores calculados e analisados (em parênteses): PB 16,00 (15,92); Leu 1,10 (1,15); Val 0,59 (0,63); Ile 0,77 (0,79); Lys 1,12 (1,10); Met+Cys 0,82 (0,79); Arg 1,19 (1,23).

Aos 42 dias de idade, foram colhidas amostras de sangue (2 ml /aves) da veia jugular de duas aves por unidade experimental, selecionadas com base no peso de cada repetição (média±5%). As amostras foram mantidas em gelo e centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos, sendo o soro armazenado a -80 °C até as análises. As amostras de soro foram descongeladas a 4 °C, e as concentrações séricas de triglicérides, ácido úrico, albumina, proteínas totais e glicose foram analisadas mediante o uso de kits comerciais (Gold Analisa Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), de acordo com os procedimentos descritos por Tietz (1986). A amônia sérica foi determinada conforme descrito por Ishihard et al. (1972), procedimento no qual a amônia reage com o 2-cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela enzima glutamato+desidrogenase, ocorrendo oxidação do NADH a NAD. As concentrações séricas de β-hidroxibutirato (corpos cetônicos) foram analisadas mediante ensaio colorimétrico (EnzyChrom™, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) como descrito por Hultman (1974).

Aos 42 dias de idade, foram colhidas amostras de cama, em três pontos por box, mantendo uma distância mínima de 10 cm de bebedouros e comedouros, procurando-se retirar um volume em torno de 500 gramas de amostra. Posteriormente, essas três amostras foram homogeneizadas e utilizadas imediatamente para determinar a quantidade de amônia liberada pela cama conforme a metodologia de Hernandez & Cazetta (2001), e utilizadas para analisar a MS e o teor de nitrogênio (AOAC, 2006).

Para determinação do rendimento de carcaça, aos 42 dias de idade, foi utilizada uma ave por unidade experimental, selecionada com peso de acordo com a média da repetição, bem como, submetida a seis horas de jejum, sendo abatida por insensibilização com choque elétrico e posterior sangria.

Para o cálculo do rendimento de carcaça foi considerado o peso da carcaça eviscerada, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, em relação ao peso vivo das aves que foram pesadas individualmente antes do abate. Para o rendimento dos cortes, foi considerado o rendimento do peito inteiro e pernas (coxa e sobrecoxa), que foi calculado em relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal presente ao redor da

cloaca, da bolsa cloacal, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada conforme descrito por Smith (1993), e pesada e também calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do software SAS (SAS Institute, 2009). Foram avaliados o termo linear e quadrático das variáveis independentes e a interação entre essas variáveis. Os termos que não foram significativos ($P > 0,05$) foram eliminados do modelo final e, em seguida, o teste da razão de verossimilhança foi utilizado para testar a significância entre o modelo completo e o modelo reduzido e, deste modo, determinar o modelo mais adequado. Posteriormente, foi gerada uma equação polinomial de segundo grau como descrito por Box et al. (1987):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon,$$

Onde Y é a variável resposta, X_i representa as variáveis de entrada (níveis de leucina e valina digestíveis), β_0 é a constante, β_i é o coeficiente do parâmetro linear, β_{ii} é o coeficiente do parâmetro quadrático, β_{ij} é o coeficiente da interação e ε o erro residual. O ponto estacionário (ponto de mínima ou máxima de resposta) da equação de segundo grau foi calculado tomando-se a primeira derivada da equação quadrática e igualando-a a zero, como segue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2,$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \beta_1 + 2\beta_{11} X_1 + \beta_{12} X_2 = 0,$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = \beta_2 + 2\beta_{22} X_2 + \beta_{12} X_1 = 0,$$

Em seguida, o sistema de equação foi resolvido para assim encontrar os valores de X_1 e X_2 . Quando as interações foram significativas, foram gerados gráficos tridimensionais de superfície resposta com seus respectivas curvas de contorno utilizando-se o Software StatSoft (2008). As exigências de leucina e valina digestível foram estabelecidas considerando-se o 95% de confiança do ponto de mínima ou máxima resposta. Todas as análises estatísticas foram baseadas em uma probabilidade de $P < 0,05$, salvo quando indicado o contrário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 42 dias de idade, foi observada interação ($P < 0,01$) entre o termo linear da leucina e o quadrático da valina ($\text{Leu} \cdot \text{Val}^2$) para o consumo de ração (Tabela 2). Esta interação foi mantida no modelo final ($\text{CR} = 6106,59 - 4153,852 \cdot \text{Leu} - 4906,275 \cdot \text{Val} + 2382,01 \cdot \text{Val}^2 + 8759,862 \cdot \text{LeuVal} - 4464,55 \cdot \text{LeuVal}^2$; $R^2 = 0,81$), uma vez que verificou-se a importância desta interação para explicar as respostas obtidas no consumo de ração, através do teste da Razão de Verossimilhança. Os níveis de leucina reduziram linearmente ($P < 0,05$) esta variável, enquanto que os níveis de valina resultaram em efeitos quadráticos ($P < 0,01$) diferentes para cada nível de leucina estudado (interação $\text{Leu} \cdot \text{Val}^2$), efeito que pode ser observado nos contornos do gráfico tridimensional (Figura 1), onde existe uma faixa ideal de níveis de valina para maximizar o consumo de ração, os quais estão condicionados ao nível dietético de leucina.

A partir da equação obtida e ao calcular os valores preditos foram estimados níveis de valina digestíveis de 0,88; 0,90; 0,90; 0,91 e 0,92% para maximizar o consumo de ração das aves, dentro dos níveis de leucina de 1,0% ($\text{CR} = 1952,74 + 3853,59 \cdot \text{Val} - 2082,54 \cdot \text{Val}^2$); 1,2% ($\text{CR} = 1121,97 + 5605,56 \cdot \text{Val} - 2975,45 \cdot \text{Val}^2$); 1,4% ($\text{CR} = 291,2 + 7357,53 \cdot \text{Val} - 3868,36 \cdot \text{Val}^2$); 1,6% ($\text{CR} = -539,57 + 9109,50 \cdot \text{Val} - 4761,27 \cdot \text{Val}^2$) e 1,8% ($\text{CR} = -1370,34 + 10961,48 \cdot \text{Val} - 5654,18 \cdot \text{Val}^2$), respectivamente. De acordo com os resultados, é possível afirmar que a exigência de valina para o consumo de ração aumenta linearmente conforme aumenta o nível de leucina em dietas com baixa PB ($\text{Exig. Val} = 0,834 + 0,048 \cdot \text{Leu}$; $R^2 = 0,97$), uma vez que o excesso de leucina pode aumentar o catabolismo da valina.

A suplementação de leucina na dieta aumenta a formação do α -cetoisocaproato (KIC), α -cetoácido da leucina resultante da primeira reação envolvida no catabolismo deste aminoácido, em um processo catalisado pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAT) (Brosnan & Brosnan, 2006). O KIC inibe a desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada quinase (BCKD quinase), permitindo assim, o aumento da atividade do complexo BCKD por desfosforilação da sua subunidade E1 α pelo BCKD fosfatase (Harris et al., 2005). O BCKD é um complexo enzimático chave envolvido na degradação dos três BCAA (Harris et al., 2001). Deste modo, o aumento da inclusão de leucina diminui as concentrações plasmáticas da valina e

isoleucina ao aumentar a concentração intracelular do KIC e favorecer indiretamente a ativação do complexo BCKD.

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível durante a fase de 21-42 dias de idade

Tratamento	Consumo de ração (g) ¹	Ganho de peso (g)	Conversão alimentar (g/g)
Leucina (%)			
1,00	3630,4	1942,7	1,875
1,20	3570,7	1984,0	1,807
1,40	3559,3	1934,7	1,858
1,60	3486,9	1855,1	1,900
1,80	3498,7	1828,0	1,934
Valina (%)			
0,52	3004,3	1448,0	2,084
0,67	3628,7	1959,3	1,854
0,82	3690,7	2075,3	1,779
0,97	3687,3	2044,0	1,806
1,12	3735,1	2017,8	1,852
SEM	36,45	29,92	0,02
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----		
Leu linear	0,01	0,001	0,001
Leu quadrática	0,58	0,05	0,01
Val linear	0,02	0,001	0,03
Val quadrática	0,001	0,001	0,001
Leu x Val	0,01	0,001	0,41

¹Interação Leu x Val² ($P < 0,01$); O teste da razão de verossimilhança indicou que há diferença ($P = 0,004$) entre o modelo completo e o modelo reduzido para o consumo de ração.

SEM= Erro padrão da média

O α -cetoisovalerato (KIV) e α -ceto- β -metilvalerato (KMV), α -cetoácidos da valina e isoleucina, respectivamente, inibem também o BCKD quinase, mas com menor eficácia que o KIC (Brosnan & Brosnan, 2006), razão pela qual o excesso de valina ou isoleucina resulta, na maioria das ocasiões, em pequenas depleções das concentrações dos outros

dois BCAA, como encontrado em alguns estudos (Smith & Austic, 1978; Burnham et al., 1992).

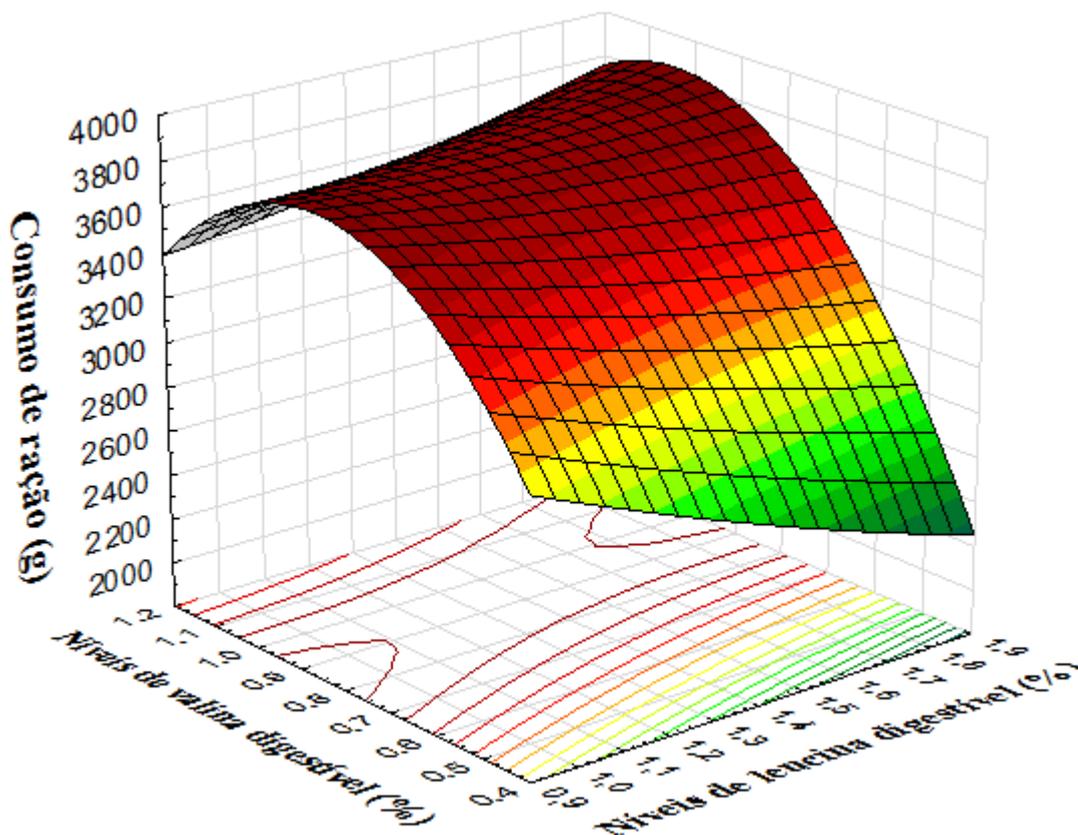


Figura 1. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre o consumo de ração de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 21 - 42 dias de idade.

Foi observada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis (Leu*Val) para o ganho de peso. Conforme a equação ajustada ($GP = -678,363 + 65,802*Leu - 298,452*Leu^2 + 6171,797*Val - 3880,634*Val^2 + 720,444*LeuVal$; $R^2 = 0,89$), o ganho de peso pode ser maximizado em dietas com baixa proteína, com a utilização de níveis dietéticos de leucina e valina de 1,15 e 0,86%, respectivamente (Figura 2).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para a conversão alimentar. Não obstante, a conversão alimentar apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$) em função dos níveis de leucina e valina digestíveis ($CA = 3,96 - 0,868*Leu + 0,347*Leu^2 - 3,736*Val + 2,07*Val^2$; $R^2 = 0,70$), com ponto de mínima estimado nos

níveis de 1,19 e 0,86%, respectivamente, representando uma relação de valina:leucina digestível de 0,72.

Relações semelhantes foram estimadas a partir das recomendações nutricionais do NRC (1990) e Rostagno et al. (2011), como valores de 0,75 e 0,72, respectivamente. Relações menores de valina:leucina, de 0,59 e 0,64 foram estimadas com base nos resultados obtidos por Tavernari et al. (2013) e Nascimento et al. (2015) para frangos de corte na fase de crescimento.

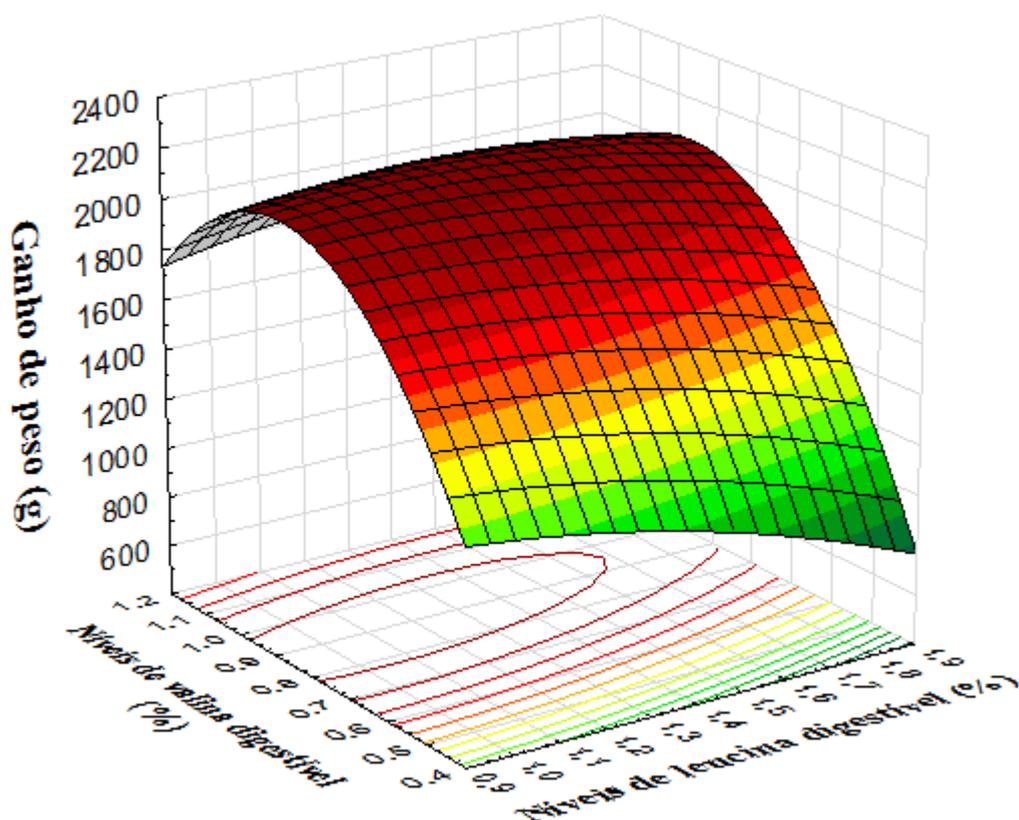


Figura 2. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre o ganho de peso de frangos de corte alimentados com dietas com baixa PB na fase de 21 - 42 dias de idade.

Poucas pesquisas estudaram a exigência de leucina para frangos de corte na fase de 21-42 dias. O NRC (1994) recomenda níveis totais de leucina de 1,09% para frangos de corte na fase de 21-42 dias, baseados apenas na exigência de lisina para este período (21-42 dias) e na relação leucina:lisina da fase de 1-21 dias, isto devido à falta de dados experimentais. No entanto, o método utilizado pelo NRC (1994), apesar de ser prático,

não considera as possíveis interações entre a leucina e os outros BCAA, fator que pode influenciar as exigências destes aminoácidos.

Embora existam várias pesquisas que determinaram as exigências de valina para frangos de corte na fase de crescimento, ainda existem algumas discrepâncias em suas estimativas. Mack et al. (1999) recomendaram níveis de valina digestível de 0,76% para aves no período crescimento, sendo esta estimativa menor às determinadas no presente estudo.

Corzo et al. (2007) estimaram níveis de valina digestível de 0,74% para frangos de corte na fase de 21-42 dias em dietas com 17% de PB. Um ano mais tarde e, mesmo utilizando aves com maior idade (28-42 dias), Corzo et al. (2008) estimaram níveis de valina digestíveis maiores, sendo estes de 0,78%. Posteriormente, Tavernari et al. (2013) e Nascimento et al. (2015) determinaram níveis de valina digestíveis de 0,80 e 0,85%, respectivamente, para aves na fase de crescimento. Estes estudos sugerem que a exigência de valina tem aumentado no decorrer dos anos, isto devido, principalmente, à rápida taxa de crescimento dos frangos de corte modernos, resultado do contínuo melhoramento genético, o que aumenta as necessidades metabólicas de nutrientes nas aves, principalmente de aminoácidos. Reforçando a necessidade de constantes atualizações nas exigências nutricionais para os frangos de corte.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre as concentrações séricas de triglicerídeos, β -hidroxibutirato (corpo cetônico), amônia, ácido úrico, albumina, proteínas totais e glicose (Tabela 3).

Embora a leucina seja um aminoácido cetogênico, o aumento dos níveis de leucina na dieta reduziram linearmente ($P < 0,05$) as concentrações séricas de triglicerídeos ($TG = 61,245 - 6,6133 * Leu$; $R^2 = 0,92$) e β -hidroxibutirato ($\beta\text{-OHB} = 11,171 - 1,696 * Leu$; $R^2 = 0,70$) nos frangos de corte. A leucina evidenciou aumentar o gasto energético de ratos (Zhang et al., 2007; Binder et al., 2013), provavelmente, ao aumentar atividade no hipotálamo do alvo mecanístico de rapamicina (*mechanistic Target of Rapamycin* - mTOR) (Cota et al., 2006).

A ativação do mTOR hipotalâmico aumenta a expressão do pró-opiomelanocortina (POMC) no núcleo arqueado do hipotálamo, reduzindo o consumo de ração e aumentando o gasto energético (Cota et al., 2006; Martínez de Morentin et al., 2014). Deste modo, a suplementação de leucina pode ter reduzido os níveis sanguíneos de triglicerídeos das aves ao ativar os neurônios hipotalâmicos, via mTOR, que expressam o POMC, reduzindo o consumo de energia e, portanto, o estoque energético. Do mesmo modo, a

menor ingestão de alimento nos altos níveis de leucina pode ter reduzido a disponibilidade de nutrientes para o crescimento das aves, minimizando assim, as reservas energéticas nos tecidos.

Tabela 3. Níveis séricos de triglicerídeos (TG), β -hidroxibutirato (β -OHB), amônia, ácido úrico, glicose, albumina e proteínas totais (PT) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível aos 42 dias de idade

Tratamento	TG (mg/dL)	β -OHB (mg/dL)	Amônia (mmol/L)	Ácido Úrico (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Albumina (g/dL)	PT (g/dL)
Leucina							
(%)							
1,00	55,13	9,92	4,78	4,56	251,47	1,51	3,22
1,20	52,51	8,74	4,98	4,74	254,59	1,37	3,31
1,40	52,43	8,48	5,04	4,80	246,47	1,43	3,07
1,60	50,17	8,50	5,17	5,00	256,14	1,50	2,90
1,80	49,69	8,34	5,53	4,94	250,48	1,46	3,18
Valina (%)							
0,52	51,96	8,84	5,56	4,21	249,15	1,41	3,03
0,67	52,63	8,43	5,35	4,70	252,40	1,36	3,01
0,82	51,23	8,94	4,60	5,37	257,79	1,59	3,30
0,97	52,18	8,82	4,94	4,95	251,57	1,42	3,09
1,12	51,93	8,96	5,06	4,80	248,23	1,49	3,25
SEM	0,74	0,16	0,13	0,11	2,08	0,03	0,07
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----						
Leu linear	0,01	0,01	0,04	0,21	0,98	0,89	0,34
Leu quadrática	0,73	0,57	0,72	0,71	0,99	0,56	0,49
Val linear	0,92	0,08	0,09	0,06	0,85	0,32	0,27
Val quadrática	0,93	0,73	0,07	0,01	0,14	0,54	0,83
Leu x Val	0,53	0,92	0,33	0,62	0,10	0,98	0,55

SEM= Erro padrão da média

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) dos níveis de leucina digestível para os níveis séricos de amônia ($SA = 3,899 + 0,863*Leu$; $R^2 = 0,91$) aos 42 dias de idade, indicando um excesso de nitrogênio, resultado devido, possivelmente, ao aumento do catabolismo dos outros BCAA. Por outro lado, os níveis de valina resultaram em efeito quadrática ($P \leq 0,07$) sobre as concentrações séricas de amônia ($AS = 9,47 - 10,431*Val$

+ 5,815*Val²; R²=0,76), sendo estimada a menor concentração no nível de valina digestível de 0,85%.

Nas aves, o excesso de nitrogênio é eliminado na forma de ácido úrico, no entanto, as concentrações deste composto orgânico não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos níveis de leucina digestível. Por outro lado, os níveis de valina digestível maximizaram ($P < 0,05$) as concentrações séricas de ácido úrico (SUA = $-0,715 + 13,325*Val - 7,534*Val^2$, R² = 0,86) no nível de 0,84%.

A valina e a isoleucina são as principais fontes de carbono para a síntese endógena de glutamina (Chang & Goldberg, 1978; Brosnan & Brosnan, 2006). A glutamina favorece a remoção do excesso de amônia proveniente do metabolismo proteico (Olsen et al., 1963) e participa na formação do ácido úrico ao fornecer dois átomos de carbono na biossíntese deste composto orgânico (Stevens, 1996). Deste modo, a suplementação de valina pode ter aumentado as concentrações séricas de ácido úrico ao favorecer a síntese de glutamina e, portanto, diminuindo os níveis tóxicos de amônia. A leucina pode fornecer grupos amino na síntese da glutamina, mas não esqueletos de carbono ao ser um aminoácido estritamente cetogênico (Chang & Goldberg, 1978).

Apesar de alguns estudos indicarem que os BCAA influenciam o metabolismo da glicose (Zhang et al., 2007; Higuchi et al., 2011), as concentrações séricas de glicose não foram afetadas ($P > 0,05$) pelos níveis de leucina e valina digestíveis. Igualmente, os níveis séricos de albumina e proteínas totais não foram influenciados ($P > 0,05$).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre a emissão de amônia, umidade e nitrogênio da cama (Tabela 4). No entanto, um efeito marginal dos níveis de leucina foi observado ($P \leq 0,07$) na emissão de amônia da cama, uma vez que esta variável aumentou linearmente conforme aumentaram os níveis de leucina digestíveis na dieta, resposta que pode ser devida às altas concentrações séricas de amônia nas aves alimentadas com altos níveis de leucina. Contudo, a umidade e conteúdo de nitrogênio da cama não foram afetados ($P > 0,05$) pelos tratamentos.

Tabela 4. Emissão de amônia, umidade e teor de nitrogênio da cama de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível aos 42 dias de idade

Tratamento	Emissão de amônia (mg NH ₃ /100g MS dia)	Umidade (%)	Nitrogênio (g/dL)
Leucina (%)			
1,00	2,35	39,63	3,13
1,20	2,34	39,56	3,05
1,40	2,42	39,64	3,09
1,60	2,84	39,63	3,10
1,80	2,77	39,54	3,14
Valina (%)			
0,52	3,00	39,60	3,10
0,67	2,52	39,58	3,05
0,82	2,17	39,59	3,12
0,97	2,67	39,65	3,08
1,12	2,36	39,57	3,17
SEM	0,11	0,03	0,02
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----		
Leu linear	0,07	0,98	0,63
Leu quadrática	0,81	0,23	0,34
Val linear	0,13	0,16	0,35
Val quadrática	0,18	0,24	0,42
Leu x Val	0,54	0,99	0,56

SEM= Erro padrão da média

Não foi observada interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre os rendimento de carcaça e de cortes e o teor gordura abdominal (Tabela 5). Houve efeito quadrático ($P \leq 0,05$) dos níveis de leucina e valina digestíveis para o rendimento do peito (Peito= $32,85 + 11,17 \cdot \text{Leu} - 4,693 \cdot \text{Leu}^2$; $R^2 = 0,97$) e da coxa (Coxa= $20,85 + 24,75 \cdot \text{Val} - 14,98 \cdot \text{Val}^2$; $R^2 = 0,91$), respectivamente. A leucina permitiu maximizar o rendimento do peito no nível de 1,13%, enquanto que a valina otimizou o rendimento da coxa no nível de 0,78%. Esse resultado demonstra que os níveis de leucina e valina digestíveis necessários para aumentar o rendimento do peito e da coxa parecem ser

menores que os requeridos para um ótimo desempenho. Estudos prévios também reportaram menor exigência de aminoácidos para otimizar o rendimento de cortes do que para maximizar o desempenho das aves (Mack et al., 1999; Corzo et al., 2007).

Tabela 5. Rendimento de carcaça, cortes e gordura abdominal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de leucina e valina digestível aos 42 dias de idade

Tratamento	Carcaça (%)	Peito (%)	Coxa (%)	Gordura abdominal (%)
Leucina (%)				
1,00	70,19	39,32	30,07	4,14
1,20	70,78	39,59	30,11	3,91
1,40	70,44	38,91	30,19	3,75
1,60	70,68	38,36	30,61	3,70
1,80	70,31	36,67	30,64	3,58
Valina (%)				
0,52	70,21	37,58	30,20	4,48
0,67	70,13	39,03	31,33	4,01
0,82	70,31	38,59	30,66	3,54
0,97	70,82	38,95	30,44	3,42
1,12	70,92	38,71	28,98	3,64
SEM	0,17	0,26	0,20	0,10
Anova	----- <i>P-Valor</i> -----			
Leu linear	0,91	0,01	0,21	0,03
Leu quadrática	0,34	0,05	0,83	0,65
Val linear	0,08	0,13	0,01	0,01
Val quadrática	0,63	0,18	0,001	0,17
Leu x Val	0,27	0,63	0,71	0,95

SEM= Erro padrão da média

Houve efeito linear decrescente ($P < 0,05$) dos níveis de valina ($GA = 5,371 - 1,726*Val$; $R^2 = 0,89$) e leucina digestíveis ($GA = 4,633 - 0,551*Leu$; $R^2=0,94$) no teor de gordura abdominal. A leucina pode ter reduzido o teor de gordura ao diminuir os níveis de triglicerídeos no sangue e, possivelmente, no tecido adiposo. Entretanto, a valina não

afetou as concentrações séricas de triglicerídeos e de β -hidroxibutirato, indicando que este aminoácido pode atuar no metabolismo dos lipídios de forma diferente da leucina. Estudo prévio relatou o papel da valina no controle da síntese de ácidos graxos (Taylor & Halperin, 1975). Deste modo, a suplementação de valina pode ter reduzido o conteúdo de gordura abdominal ao diminuir a síntese de ácidos graxos, no entanto, sem estimular a degradação dos lipídios.

Após realizar uma extensa revisão de literatura, ficou evidente que são escassas as estimativas das exigências dos BCAA para frangos de corte na fase crescimento (21-42 dias), principalmente, com relação ao aminoácido leucina. No presente estudo, o desempenho melhorou até o nível de leucina digestível de 1,19%, sendo este valor maior que o nível recomendado na literatura, sugerindo a necessidade de redefinir as exigências deste aminoácido, as quais podem estar subestimadas em dietas com menores níveis proteicos.

Acima de 1,19% de leucina digestível em dietas com baixa proteína, o efeito antagônico da leucina sobre a valina manifestou-se, prejudicando os parâmetros produtivos das aves. O consumo de ração foi a variável mais afetada pela interação leucina-valina. A adição dietética de valina aumentou o consumo de ração, minimizando parcialmente o efeito negativo da leucina sobre esta variável, o que conseqüentemente aumenta sua exigência.

Embora dietas com menor conteúdo de proteína tenham demonstrado aumentar o teor de gordura na carcaça das aves, a suplementação de leucina e valina, em níveis adequados, nestas dietas pode melhorar a qualidade da carcaça, ao reduzir a deposição de gordura, aumentando assim, a deposição de tecido magro.

CONCLUSÃO

Baseado na conversão alimentar, a exigência de leucina e valina digestível é de 1,19 e 0,86%, respectivamente, para frangos de corte na fase de crescimento em dietas com menor nível proteico. A suplementação de leucina e valina pode melhorar o metabolismo dos lipídeos, evitando o aumento da deposição de gordura de aves submetidas a dietas com baixa proteína bruta na fase de crescimento.

REFERÊNCIAS

- Aftab, U., M. Ashraf, and Z. Jiang. 2006. Low protein diets for broilers. *World's Poultry Sci. J.* 62:688-701.
- AOAC. 2006. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Binder, E., F. J. Bermudez-Silva, M. Elie, T. Leste-Lasserre, I. Belluomo, S. Clark, A. Duchamp, G. Mithieux, and D. Cota. 2014. Leucine supplementation modulates fuel substrates utilization and glucose metabolism in previously obese mice. *Obesity*. 22(3):713-20.
- Brosnan, M. E., and J. Letto. 1991. Interorgan metabolism of valine. *Amino Acids*. 1(1):29-35.
- Brosnan, J. T., and M. E. Brosnan. 2006. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J. Nutr.* 136:207S-211S.
- Burnham, D., G. C. Emmans, and R. M. Gous. 1992. Isoleucine requirements of the chicken: The effect of excess leucine and valine on the response to isoleucine. *Br. Poultry Sci.* 33:71-87.
- Chang, T. W., and A. L. Goldberg. 1978. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 253:3685-95.
- Corzo, A., M. T. Kidd, W. A. Dozier, and S. L. Vieira. 2007. Marginality and Needs of Dietary Valine for Broilers Fed Certain All-Vegetable Diets. *J. Appl. Poultry Res.* 16: 546-554.
- Corzo, A., W. A. Dozier III, and M. T. Kidd. 2008. Valine nutrient recommendations for Ross × Ross 308 broilers. *Poultry Sci.* 87:335-338.
- Cota, D., K. Proulx, K. A. Blake Smith, S. C. Kozma, G. Thomas, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 312:927-930.
- D'Mello, J. P. F., and D. Lewis. 1970. Amino acid interactions in chick nutrition. 2. Interrelationships between leucine, isoleucine, and valine. *Br. Poultry Sci.* 11:313-323.
- Harper, A. E., R. H. Miller, and K. P. Block. 1984. Branched-chain amino acid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 4:409-454.
- Harris, R. A., R. Kobayashi, T. Murakami, and Y. Shimomura. 2001. Regulation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. *J. Nutr.* 131(3):841S-845S.
- Harris, R. A., M. Joshi, N. H. Jeoung, and M. Obayashi. 2005. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.* 135:1527S-1530S.
- Hernandes, R., and J. O. Cazetta. 2001. A simple and accessible method to measure the ammonia produced from broiler litter. *Rev. Bras. Zootec.* 30:824-829.
- Higuchi, N., M. Kato, M. Miyazaki, Tanaka M, M. Kohjima, T. Ito, M. Nakamuta, M. Enjoji, K. Kotoh, R. Takayanagi. 2011. Potential role of branched-chain amino acids in glucose metabolism through the accelerated induction of the glucose-sensing apparatus in the liver. *J. Cell Biochem.* 112: 30-38.
- Holecek, M. 2002. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition*. 18:130-133.
- Hultman, E. 1974. Ketone bodies in blood and urine in clinical biochemistry: principles and methods. In: Curtis, H.C., Roth, M. (Eds.), vol. II. Walter de Gruyter, Hawthorne 10532, NY.

- Ishihara, A., K. Kurahasi, and H. Uehara. 1972. Enzymatic determination of ammonia in blood and plasma. *Clin. Chim. Acta.* 41: 255–261.
- Langer, S., P. W. Scislawski, D. S. Brown, P. Dewey, and M. F. Fuller. 2000. Interactions among the branched-chain amino acids and their effects on methionine utilization in growing pigs: effects on plasma amino- and keto-acid concentrations and branched-chain keto-acid dehydrogenase activity. *Br. J. Nutr.* 83(1):49-58.
- Mack, S., D. Bercovici, G. DeGroote, B. Leclercq, M. Lippens, M. Pack, J. B. Schutte, and S. Van Cauwenberghe. 1999. Ideal amino acid profile and dietary lysine specification for broiler chickens of 20 to 40 days of age. *Br. Poult. Sci.* 40:257–265.
- Martínez de Morentin P. B., N. Martínez-Sánchez, J. Roa, J. Ferno, R. Nogueiras, M. Tena-Sempere, C. Dieguez, M. Lopez. 2014. Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Curr Mol Med.* 14(1):3-21.
- May, R. C., N. Piepenbrock, R. A. Kelly, and W. E. Mitch. 1991. Leucine-induced amino acid antagonism in rats: muscle valine metabolism and growth impairment. *J. Nutr.* 121(3):293-301.
- Nascimento, G. R., A. E. Murakami, I. C. Ospina-Rojas, M. D. Vargas, R. G. Garcia. 2015. Valina digestível em dietas com baixo teor proteico para frangos de corte. *Cienc. Rural.* In press.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry.* 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Olsen, E. M., D. C. Hill, and H. D. Branion. 1963. The Effect of Dietary Diammonium Citrate on Glutamine and Glutamic Acid Concentration in the Blood Plasma of Chicks. *Poult. Sci.* 42(5):1177-1181.
- Platell, C., S. E. Kong, R. McCauley, and J. C. Hall. 2000. Branched-chain amino acids. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15(7):706-17.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. de Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. *Brazilian tables for poultry and swine: feed composition and nutritional requirements.* 3rd ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- SAS Institute. 2009. *SAS Proprietary Software, Release 9.2.* SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Smith, M. O. 1993. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. *Poult. Sci.* 72:1146-1150.
- Smith, T. K., and R. E. Austic. 1978. The branched-chain amino acid antagonism in chicks. *J. Nutr.* 108:1180–1191.
- StatSoft. 2008. *Statistica Data Analysis Software System.* Version 8.0. StatSoft Inc., Tulsa, OK.
- Stevens, L. 1996. Protein and amino acid metabolism. Pages 65–79 in *Avian Biochemistry and Molecular Biology.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Tavernari, F. C., G. R. Lelis, R. A. Vieira, H. S. Rostagno, L. F. Albino, and A. R. Oliveira Neto. 2013. Valine needs in starting and growing Cobb (500) broilers. *Poult. Sci.* 92:151-157.
- Taylor, W. M., and M. L. Halperin. 1975. Effect of valine on the control of fatty acid synthesis in white adipose tissue of the rat. *Can. J. Biochem.* 53:1054–1060.
- Tietz, N. W. 1986. *Fundamentals of clinical chemistry.* Page 1,186 in *Clinical Chemistry.* WB Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Zhang, Y., K. Guo, R. E. LeBlanc, D. Loh, G. J. Schwartz, Y. H. Yu. 2007. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes.* 56:1647–1654.

V - Expressão dos genes envolvidos na tradução do RNAm em proteína no músculo *pectoralis major* e parâmetros ósseos de frangos de corte suplementados com leucina e valina

RESUMO – Foram realizados três experimentos com objetivo de estudar o efeito da suplementação de leucina e valina sobre a expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 e eEF2 no tecido muscular das aves no período de 1-21 dias (experimento I), e compreender o efeito destes aminoácidos sobre o diâmetro do músculo *pectoralis major* e os parâmetros ósseos de frangos de corte na fase de 1-21 (experimento II) e de 21-42 dias de idade (experimento III). No experimento I, foram utilizados 540 pintos de corte machos de um dia de idade, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3, totalizando 9 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de três níveis de leucina (1,00; 1,48 e 1,96%) e três níveis de valina (0,60; 0,90 e 1,20%). No experimento II (1-21 dias) e III (21-42 dias), foram utilizados 1.500 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress® distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x5, totalizando 25 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os níveis de leucina e valina digestíveis utilizados na fase inicial (experimento II) variaram de 1,00 a 1,96% e de 0,60 a 1,20%, enquanto que na fase de crescimento (experimento III), foram de 1,00 a 1,80% e de 0,52 a 1,12%, respectivamente. Não houve ($P > 0,05$) interação entre os níveis de leucina e valina sobre a expressão do RNAm dos genes estudados aos 21 dias, nem para o diâmetro da fibra muscular do músculo *pectoralis major* das aves aos 21 e 42 dias de idade. A suplementação de leucina aumentou ($P < 0,05$) a expressão do RNAm dos genes mTOR e S6K1 no tecido muscular e reduziu linearmente ($P < 0,05$) a área da zona de cartilagem hipertrófica da tíbia dos frangos aos 21 dias de idade. A adição de valina na dieta não influenciou ($P > 0,05$) a expressão dos genes estudados. Foi observada interação ($P \leq 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para a resistência óssea da tíbia aos 21 dias, mas não aos 42 dias de idade ($P > 0,05$). A suplementação de leucina pode estimular a expressão do RNAm dos genes mTOR e S6K1 no músculo *pectoralis major* dos frangos de corte na fase inicial. Níveis adequados de leucina e valina podem ser essenciais na formação da estrutura óssea, resultando em ossos com maior resistência em frangos de corte no período de 1-21 dias de idade.

Palavras-chave: expressão gênica, músculo esquelético, tradução

V – Expression of genes involved in mRNA translation into protein in *pectoralis major* muscle and the bone parameters of broilers supplemented with leucine and valine

ABSTRACT - Three experiments were conducted to evaluate the effect of leucine and valine supplementation on mRNA expression of genes mTOR, S6K1 eIF4E·4EBP1 and eEF2 in the muscle tissue of broilers from 1-21 days (experiment I), and to understand the effect of these amino acids on the fiber diameter of the *pectoralis major* muscle and bone parameters of broiler chickens from 1-21 (experiment II) and 21-42 days old (experiment III). In the experiment I, a total of 540 1-day-old Cobb-Vantress® male broilers were distributed in a completely randomized experimental design in a 3x3 factorial arrangement with 9 treatments with three replicate pens of 20 birds each. Treatments consisted of three dietary levels of digestible leucine (1.00; 1.48 and 1.96 %) and three levels of digestible valine (0.60; 0.90 and 1.20 %). In the experiment II (1-21 days) and III (21-42 days), a total of 1,500 1-day-old Cobb-Vantress® male broilers were distributed in a completely randomized experimental design in a 5x5 factorial arrangement with 25 treatments with three replicate pens of 20 birds each. Digestible leucine and valine levels ranged from 1.00 up to 1.96%, and 0.60 up to 1.20% for the starter phase (experiment II), while for the grower phase (experiment III) ranged from 1.00 up to 1.80%, and 0.52 up to 1.12%, respectively. There was no interaction ($P > 0.05$) between the levels of leucine and valine on mRNA expression of the studied genes or on the diameter of the *pectoralis major* muscle of the poultry at 21 and 42 days of age. Leucine supplementation increased ($P < 0.05$) mRNA expression of mTOR and S6K1 in pectoral muscle and decrease ($P < 0.05$) the hypertrophic zone of the growth plate of broilers at 21 days. Dietary valine did not affect ($P > 0.05$) the expression of the studied genes. There was an interaction ($P \leq 0.05$) between digestible levels of leucine and valine on tibia bone strength of broilers at 21 days, but not at 42 days of age ($P > 0.05$). Leucine supplementation may stimulate mRNA expression of mTOR and S6K1 in *pectoralis major* muscle of broilers during the starter phase. Appropriate levels of leucine and valine can be essential in the formation of bone structure, resulting in increased resistance to bones in broilers in the period from 1-21 days of age.

Key words: gene expression, skeletal muscle, translation

INTRODUÇÃO

Altos níveis de leucina no plasma de suínos e ratos podem ativar o receptor intracelular mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) (Crozier et al., 2005; Glynn et al., 2010; Torrazza et al., 2010; Suryawan et al., 2012). A ativação do mTOR culmina em aumento da taxa de síntese proteica, crescimento e proliferação celular (Richards et al., 2010).

O mTOR favorece o acréscimo da síntese proteica por meio da fosforilação da proteína ribossomal S6 quinase (S6K1) e da proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1), duas proteínas que envolvem a fase de iniciação da síntese de proteínas (Lynch et al., 2002). Do mesmo modo, através da via de sinalização do mTOR, a leucina também pode estimular a fase de alongação da tradução ao inibir a fosforilação do fator eucariótico de alongamento 2 (eEF2) (Proud, 2002).

Estudos prévios indicaram que as aves expressam amplamente um gene homólogo ao mTOR de mamíferos, localizado no cromossoma 21 das aves (Tesseraud et al., 2003; Richards & Proszkowiec-Weglarz, 2007). Da mesma forma, assim como em mamíferos, a leucina também ativa a fosforilação da proteína S6K1 nas aves (Bigot et al., 2003; Everaert et al., 2010). Portanto, a suplementação de leucina na dieta de frangos de corte poderia estimular a síntese proteica da mesma maneira como ocorre nos mamíferos.

Alguns pesquisadores reportaram interação entre a leucina e a valina sobre o desempenho de frangos de corte. Contudo, desconhece-se as possíveis inter-relações entre estes aminoácidos sobre a expressão dos genes envolvidos na síntese de proteínas no tecido muscular das aves.

Após o desenvolvimento embrionário, o crescimento das fibras musculares ocorre apenas por hipertrofia, este aumento do diâmetro da fibra muscular resulta, principalmente, da maior deposição de proteínas miofibrilares (actina e miosina) (Ashmore et al., 1972), sendo estas proteínas compostas principalmente por aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (Shimomura & Harris, 2006). Considerando que os BCAA são metabolizados primeiramente no músculo esquelético e que são fonte importante de energia e substratos para a síntese proteica muscular, sua suplementação poderia influenciar o diâmetro das fibras musculares nas aves.

Os problemas locomotores representam uma das principais causas de mortalidade de aves na fase final de criação, comprometendo o bem-estar animal (Knowles et al, 2008) e a qualidade de carcaça, significando altas perdas econômicas para o setor avícola. A

discondroplasia tíbia é uma das principais causas de claudicação nos frangos de corte, caracteriza-se por ser uma lesão avascular com cartilagem anormal não calcificada, resultante de uma acumulação de condrócitos imaturos, com uma vida útil estendida, na tíbia proximal (Leach & Monsonego-Ornan, 2007).

Pouco sabe-se do papel dos BCAA sobre o metabolismo ósseo dos frangos de corte. Em ratos, a restrição de leucina comprometeu o desenvolvimento ósseo, visto que bloqueia a sinalização da via mTOR (Kim et al., 2008), proteína importante para modular o crescimento ósseo (Phornphutku et al., 2008). Farran & Thomas (1992) indicaram que relações adequadas dos BCAA são essenciais para que os osteoblastos formem a matriz óssea, bem como para facilitar a calcificação e proliferação das células do osso.

Baseado nessas informações, foram realizados três experimentos com objetivo de estudar o efeito da suplementação de leucina e valina sobre a expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 (complexo inibidor do fator de iniciação eucariótico 4G) e eEF2 no tecido muscular das aves aos 21 dias (Experimento I), e compreender o efeito destes aminoácidos sobre o diâmetro do músculo *pectoralis major* e parâmetros ósseos de frangos de corte na fase de 1-21 (Experimento II) e de 21-42 dias de idade (Experimento III).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Avicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá - UEM. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 107/2012).

As aves foram alojadas em um galpão climatizado com ventilação de pressão negativa e placa evaporativa. As aves foram criadas em boxes de 2,0 m². Empregou-se um programa de iluminação contínua durante a primeira semana e de 23 horas de luz diárias, até o final do período. O material utilizado como cama foi maravalha de primeiro uso. Água e ração foram fornecidos à vontade.

Foram analisados o conteúdo de aminoácidos totais (método 994,12) e proteína (método 968,06) de todos os ingredientes (milho, farinha de carne e ossos, farelo de soja e farelo de trigo) antes da formulação das rações e de amostras representativas das dietas experimentais, de acordo com os procedimentos do AOAC (2006). Os valores de

aminoácidos digestíveis dos ingredientes foram calculados utilizando-se os coeficientes de digestibilidade de Rostagno et al. (2011) e o conteúdo analisado de aminoácidos totais.

Nos três experimentos, a ração basal foi formulada de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais para frangos de corte machos de desempenho médio de Rostagno et al. (2011), exceto para a leucina e valina digestível (Tabela 1). As demais rações experimentais foram obtidas mediante a suplementação de leucina e valina na ração basal, em substituição ao inerte.

Experimento I

Foram utilizados 540 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress®, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3, totalizando 9 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de três níveis de leucina digestível (1,00; 1,48 e 1,96%) e três níveis de valina digestível (0,60; 0,90 e 1,20%).

Aos 21 dias de idade, três aves por tratamento foram sacrificadas e amostras do tecido muscular (*Pectoralis major*) foram coletadas para determinar a expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 e eEF2.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido, sendo homogeneizados utilizando-se homogeneizador Polytron (tecido + Trizol) até a completa dissociação. Posteriormente, foi adicionado 200 uL de clorofórmio e homogeneizado manualmente. As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpms a 4°C, sendo a fase líquida coletada e transferida para tubo estéril, com adição de 500 µL de isopropanol em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpms, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado novamente a 7.500 rpms por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pelet foi ressuscitado em água ultrapura livre de RNase.

A concentração total, qualidade e integridade do RNA foi determinada utilizando-se espectrofotômetro (NanoDrop ND 1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Um micrograma de RNA foi incubado com DNase I (Invitrogen Corporation, Brasil) e, posteriormente, a DNase I foi inativada pela adição de EDTA e aquecimento a 65°C por 5 min.

Tabela 1. Composição percentual e calculada da dieta basal dos experimentos I, II (1 – 21 dias) e II (21-42 dias).

Item	1-21 d (Experimento I e II)	21-42 d (Experimento I e II)
Ingrediente, %		
Milho	65,08	70,11
Farelo de soja 45%	8,95	9,73
Farelo de trigo	7,00	5,04
Farinha de carne e osso 49%	5,55	3,09
Óleo de soja	2,69	3,50
Fosfato Bicálcico	0,23	0,35
Calcário	0,24	0,44
Sal comum	0,40	0,40
Cloreto de potássio	0,24	0,24
Supl, Min – Vit ^{1,2}	0,40	0,40
Inerte (Caulim) ³	2,00	1,60
L-Glu 99,4%	3,50	2,50
DL-Met 99%	0,54	0,41
L-Lys HCl 78,5%	0,96	0,74
L-Thr 98%	0,41	0,29
L-Val 98%	0,09	0,02
L-Ile 98%	0,44	0,32
L-Arg 99%	0,59	0,43
L-Trp 98%	0,11	0,09
Gly 97%	0,58	0,30
Composição calculada^{4,5}		
PB, %	18,50	16,00
EM, kcal/kg	2.975	3.125
Cálcio, %	0,87	0,69
Cloro, %	0,32	0,31
Fosforo disponível, %	0,43	0,32
Potássio, %	0,59	0,58
Sódio, %	0,22	0,20
Gly+Ser dig, %	1,83	1,40
Arg dig, %	1,34	1,13
Ile dig, %	0,83	0,71
Lys dig, %	1,24	1,04
Met+Cys dig, %	0,90	0,76
Thr dig, %	0,81	0,68
Trp dig, %	0,21	0,19
Leu dig, %	1,00	1,00
Val dig, %	0,60	0,52
Fibra bruta, %	2,26	2,27
Relação AEE:AANE	42:58	42:58
BED, mEq/kg	154	148

¹Suplemento vitamínico e mineral Inicial (Conteúdo por kg de ração): Vit. A, 2167 UI; Vit. D3, 1233 UI; Vit. E, 3500 UI; Vit. K3, 1,7 mg; Vit. B1, 1,6 mg; Vit. B12, 16,7 µg; riboflavina, 5,3

mg; piridoxina, 4 mg; niacina, 36 mg; ácido pantotênico, 13 mg; ácido fólico, 0,8 mg; d-biotina, 0,1 mg; cloreto de colina, 270; BHT, 5,8 mg; Fe, 50 mg; Cu, 12 mg; I, 0,9 mg; Zn, 50 mg; Mn, 60 mg; Se, 0,2 mg; Co, 0,2 mg.

²Suplemento vitamínico e mineral de crescimento (Conteúdo por kg de ração): Vit. A, 2148 UI; Vit. D3, 1225 UI; Vit. E, 3100 UI; Vit. K3, 1,5 mg; Vit. B1, 1,6 mg; vit. B12, 16,7 ug; riboflavina, 5,3 mg; piridoxina, 2,5 mg; niacina, 36 mg; ácido pantotênico, 13 mg; ácido fólico, 0,8 mg; d-biotina, 0,1 mg; cloreto de colina, 270; BHT, 5,8; Fe, 50 mg; Cu, 12 mg; I, 0,9 mg; Zn, 50 mg; Mn, 60 mg; Se, 0,2 mg; Co, 0,2 mg.

³Inerte (Caulim) – A adição de AA industriais foi em substituição ao inerte.

⁴Valores calculados e analisados na fase inicial (em parênteses): PB 18,50 (18,22); Leu 1,10 (1,14); Val 0,68 (0,71); Ile 0,92 (0,89); Lys 1,37 (1,32); Met+Cys 0,99 (0,95); Arg 1,39 (1,44).

⁵Valores calculados e analisados na fase de crescimento (em parênteses): PB 16,00 (15,92); Leu 1,10 (1,15); Val 0,59 (0,63); Ile 0,77 (0,79); Lys 1,12 (1,10); Met+Cys 0,82 (0,79); Arg 1,19 (1,23).

Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix e Oligo d(T) (Invitrogen Corporation, Brasil), e RNase out (Invitrogen Corporation, Brasil) para degradação de mRNA, de acordo com as normas do fabricante. A reação foi realizada a 42°C por 15 min, 50°C por 50 min, e 70°C por 15 min. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador iQ5™ Bio-Rad (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA), utilizando-se os seguintes parâmetros de ciclo: 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 seg e anelamento por 1 min em diferentes temperaturas (Tabela 2) e curva de Melting a 55°C por 30 seg para avaliar a especificidade de cada produto da PCR. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas com controle negativo adicionado em todas as placas para controlar possíveis contaminações nas reações.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ampliação dos genes alvos (mTOR, S6K1, 4E-BP1 e eEF2) foram baseados nas sequências de nucleotídeos utilizados por Lee et al. (2012) de acordo com as sequências de frangos (nº de acesso GenBank - XM_417614, XM_415882, XM_424384, NM_205368 e XM_416323, respectivamente). Foi utilizado o gene GAPDH como controle endógeno conforme descrito por Gilbert et al. (2007). O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para frangos (S:sense; A: Antisense)

Gene	Amplicom (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Sequências dos primers (5'-3')
mTOR ¹	119	59	S: TTGGGTTTGCTTTCTGTGGCTGTC A:ACAGACTTCTGCCTCTTGTGAGCA
S6K1 ¹	123	63	S: TTTGCCTCCCTACCTCACACAAGA A: AAGAACGGGTGAGCCTGAACTTCT
eIF4E•4 EBP1 ¹	88	59	S: ATGGAGTGCCGTAATTCTCCGGTT A: ACTCCTCCACAATTGGGCTGGTAA
eEF2 ¹	99	59	S: AGCCAATCCAAAGGACCATCCTCA A: ACTGATCAACACCAACCAGACCGA
GAPDH ²	73	53	S: GCCGTCCTCTCTGGCAAAG A: TGTAACCATGTAGTTCA

¹Sequência de nucleotídeos obtida de Lee et al. (2012).

²Sequência de nucleotídeos obtida de Gilbert et al. (2007).

Experimento II (1-21 dias)

Foram utilizados 1.500 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress® distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x5, totalizando 25 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de leucina digestível (1,00; 1,24; 1,48; 1,72 e 1,96%) e cinco níveis de valina digestível (0,60; 0,75; 0,90; 1,05 e 1,20%).

Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental foi sacrificada, selecionada com base no peso médio do box (média±5%) para análise do diâmetro da fibra muscular e os parâmetros ósseos.

Após o sacrifício, foi coletado o músculo peitoral (*Pectoralis major*) e reduzido a fragmentos de aproximadamente 1 cm x 1 cm x 2,5 cm, os quais foram estocadas imediatamente em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos congelados foram transferidos para a câmara de um micrótomo criostato a -20°C e fixados perpendicularmente no suporte metálico do criostato utilizando-se resina especial *Tissue Tek, OCT - Optimal Critical Temperature Compound*. Foram realizados cinco cortes, com 10 micrômetros de espessura, orientados no sentido transversal da fibra, capturados com lâmina de vidro para histologia (Pullen, 1977).

Para a mensuração do diâmetro da fibra muscular do *Pectoralis major*, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas em microscópio de luz acoplado a uma câmera digital. As imagens obtidas foram analisadas através do programa

Imagem-Pro®. Foram capturadas dez imagens do tecido muscular, por corte, com ampliação final equivalente à objetiva 10X. Foram mensuradas todas as fibras das dez imagens, utilizando-se para isto o método de mensuração do menor diâmetro da fibra conforme Dubowitz & Brooke (1973).

Para avaliação dos parâmetros ósseos, foram coletadas as duas pernas de uma ave por unidade experimental aos 21 dias de idade, sendo congeladas a -20° C até o início das análises. Após o descongelamento das pernas, o tecido muscular aderido foi retirado com auxílio de tesouras e pinças, separando a tíbia. Posteriormente, a tíbia esquerda foi pesada em balança analítica ($g \pm 0,0001$) e o comprimento e o diâmetro foram medidos na porção média usando paquímetro eletrônico digital (mm). O índice de Seedor foi calculado ao dividir o peso do osso por seu comprimento, conforme proposto por Seedor et al. (1993).

A análise de resistência óssea foi realizada com os ossos descongelados *in natura* (tíbia esquerda) utilizando-se o texturômetro - TAXT2i com um movimento de haste de 5 mm/minuto e com carga de 25 kg. Os valores foram expressos em quilograma força (kgf). Após o ensaio de resistência óssea, os ossos foram preparados para a determinação do teor de minerais (Silva & Queiróz, 2004). Para tanto, os ossos foram desengordurados em éter de petróleo, secos em estufa de ventilação forçada, triturados e pesados em balança analítica (0,001g). Posteriormente foram secos em estufa a 105°C por 24 horas, pesados após resfriamento e calcinados em mufla a 600° C, para obtenção das cinzas. O teor de cálcio e fósforo no osso foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Silva & Queiróz (2004).

Para avaliar a incidência à discondroplasia tibial, a tíbia da perna direita foi descalcificada com ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20% (Fernandes et al., 2007). Após a descalcificação, o osso foi submetido à rotina histológica, para inclusão em parafina (Beçak & Paulete, 1976). Os cortes foram feitos com micrótomo a 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina, para observação da zona do disco epifisário e mensurações das áreas para caracterização da incidência à discondroplasia tibial.

Para análise das lâminas da cartilagem epifisária tibial, foram consideradas três regiões distintas caracterizadas pela aparência morfológica: zona de repouso, zona de cartilagem em proliferação e zona de cartilagem hipertrófica. A zona de cartilagem calcificada foi considerada como o limite inferior para determinação do espessamento da zona hipertrófica, na caracterização da lesão, segundo Thorp et al. (1993).

Foi utilizada a metodologia de determinação de áreas da cartilagem do corte histológico do perfil longitudinal da tíbia proposta por Oviedo-Rondón et al. (2001), por meio de um software para análises de imagens (Image-Pro®). Para este processo, as lâminas histológicas confeccionadas foram “scaneadas” utilizando o scanner HP ScanJet II v.2.5, utilizando-se o software o Paint Shop Pro V.5.0 para tratamento de imagem. A imagem foi digitalizada utilizando o modo “branco e preto” com qualidade de foto, com as seguintes características: brilho (variável entre 125 e 145), contraste 185 e a escala de 800%.

As imagens gravadas foram submetidas ao analisador de imagens, onde foi realizada prévia calibração em milímetros do equipamento e determinadas e medidas de três áreas: 1. Zona de cartilagem em proliferação ou placa de crescimento, 2. Zona de cartilagem hipertrófica e 3. Área total da epífise (Figura 1).

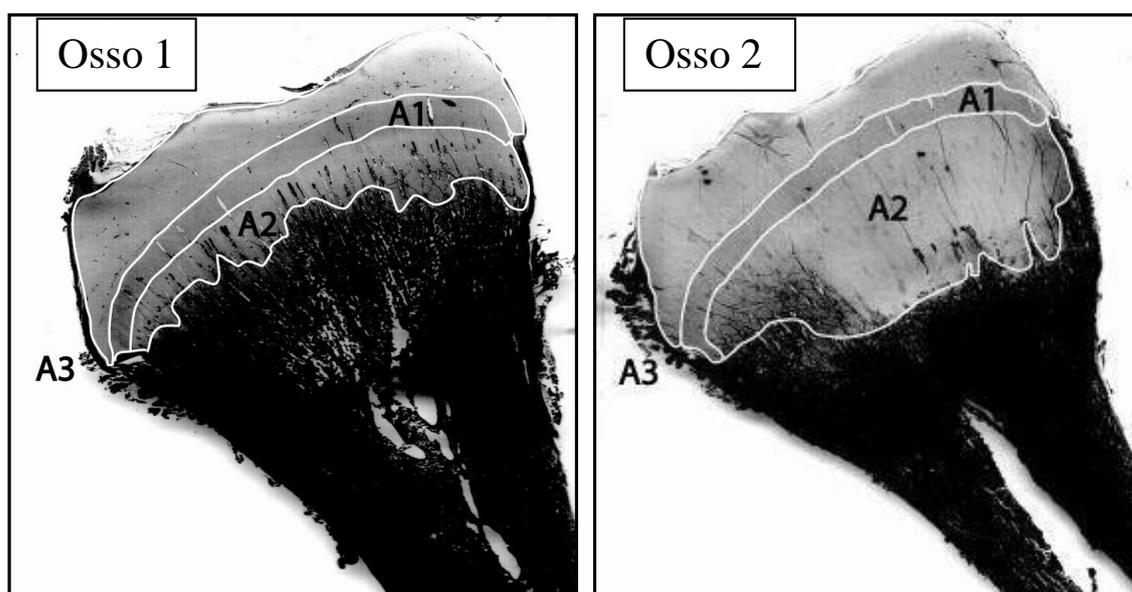


Figura 1 - Corte histológico da epífise da tíbia de um frango de corte aos 21 dias de idade sem discondroplasia (osso 1) e com a lesão (osso 2), demonstrando as áreas medidas na caracterização da lesão, sendo elas: zona de cartilagem em proliferação ou placa de crescimento (A1), zona de cartilagem hipertrófica (A2) e área total da epífise (A3).

Experimento III (21-42 dias)

Foram utilizados 1.500 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem Cobb–Vantress® distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x5, totalizando 25 tratamentos, com três repetições e 20 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de leucina digestível (1,00; 1,20; 1,40; 1,60 e 1,80%) e cinco níveis de valina digestível (0,52; 0,67;

0,82; 0,97 e 1,12%). O experimento foi conduzido durante a fase de 21-42 dias, portanto, as aves receberam uma dieta convencional até os 20 dias de idade e as dietas experimentais até os 42 dias. As análises realizadas foram as mesma descritas no experimento II.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do software SAS (SAS Institute, 2009). No experimento I, as comparações das médias foram realizadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Nos experimentos II e III, foram avaliados o termo linear e quadrático das variáveis independentes e a interação entre essas variáveis. Posteriormente, foi gerada uma equação polinomial de segundo grau como descrito por Box et al. (1987):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon ,$$

Onde Y é a variável resposta, X_i representa as variáveis de entrada (níveis de leucina e valina digestíveis), β_0 é a constante, β_i é o coeficiente do parâmetro linear, β_{ii} é o coeficiente do parâmetro quadrático, β_{ij} é o coeficiente da interação e ε o erro residual. O ponto estacionário (ponto de mínima ou máxima de resposta) da equação de segundo grau foi calculado tomando-se a primeira derivada da equação quadrática e igualando-a a zero, como segue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2,$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \beta_1 + 2\beta_{11} X_1 + \beta_{12} X_2 = 0,$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = \beta_2 + 2\beta_{22} X_2 + \beta_{12} X_1 = 0,$$

Em seguida, o sistema de equação foi resolvido para assim encontrar os valores de X_1 e X_2 . Quando as interações foram significativas, foram gerados gráficos tridimensionais de superfície resposta com seus respectivas curvas de contorno utilizando-se o Software StatSoft (2008). As exigências de leucina e valina digestível foram estabelecidas considerando-se o 95% de confiança do ponto de mínima ou máxima

resposta. Todas as análises estatísticas foram baseadas em uma probabilidade de $P < 0,05$, salvo quando indicado o contrário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre a expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E•4EBP1 e eEF2 (Tabela 3).

A suplementação de leucina aumentou a expressão do RNAm do gene mTOR no músculo *pectoralis major* das aves ($P < 0,05$) (Figura 2). O mTOR favorece o acréscimo da síntese proteica através da fosforilação do S6K1 e 4E-BP1, duas proteínas que compreendem a fase de iniciação da síntese de proteínas (Lynch et al., 2002).

Do mesmo modo, níveis de leucina de 1,96% resultaram em maior expressão ($P < 0,05$) do RNAm do gene S6K1 no músculo *pectoralis major* dos frangos de corte quando comparado com a expressão das aves que receberam as dietas com 1,00% de leucina. Este resultado indica que a adição dietética de leucina não só estimula a atividade (fosforilação) da proteína S6K1 indiretamente via mTOR, mas também diretamente por aumentar a expressão do gene S6K1 no tecido muscular das aves.

O 4E-BP1 impede a formação dos fatores iniciadores da tradução (Proud, 2002). A fosforilação do 4E-BP1 pelo mTOR conduz à liberação do fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4E) do composto inativo eIF4E•4EBP1, permitindo assim, a formação do complexo ativo, o eIF4E•eIF4G (complexo eIF4F). A formação do eIF4F é necessária para que a iniciação da tradução do RNAm em proteína tenha continuidade (Gingras et al., 2001).

A deficiência de aminoácidos nas células diminui a formação do complexo eIF4F, atenuando a tradução ao aumentar a ligação da proteína 4E-BP1 com o eIF4E (eIF4E•4EBP1) (Wang & Proud, 2008). Estudos prévios indicaram que a suplementação de leucina reduz a formação do complexo eIF4E•4EBP1 (Suryawan et al., 2008; Escobar et al., 2010). Contudo, no presente estudo, o aumento dos níveis de leucina na dieta não reduziram ($P > 0,05$) a expressão do complexo eIF4E•4EBP1 no músculo *pectoralis major* das aves, sugerindo que a formação desse complexo é regulado a nível traducional e não transcricional.

Tabela 3. Expressão do RNAm dos genes mTOR, S6K1, eIF4E·4EBP1 e eEF2 no músculo *pectoralis major* de frangos de corte suplementados com leucina (experimento I)¹

Leucina (%)	Valina (%)	mTOR	S6K1	eIF4E·4EBP1	eEF2
1,00	0,60	0,84	0,83	1,07	1,05
1,00	0,90	0,58	0,75	0,94	1,25
1,00	1,20	0,72	0,68	1,02	1,52
1,48	0,60	0,92	0,88	0,76	1,60
1,48	0,90	1,60	1,46	1,31	1,16
1,48	1,20	1,33	1,19	1,11	1,08
1,96	0,60	1,24	1,46	0,80	1,23
1,96	0,90	1,71	1,57	0,97	1,36
1,96	1,20	1,78	1,30	1,19	1,08
SEM		0,13	0,09	0,05	0,07
Leucina (%)					
1,00		0,71 ^b	0,75 ^b	1,01	1,27
1,48		1,24 ^{ab}	1,14 ^{ab}	1,03	1,29
1,96		1,58 ^a	1,44 ^a	0,99	1,22
Valina (%)					
0,60		1,00	1,05	0,88	1,29
0,90		1,26	1,23	1,05	1,27
1,20		1,27	1,05	1,11	1,23
Anova		-----P-Valor-----			
Leucina		0,03	0,01	0,93	0,91
Valina		0,59	0,55	0,15	0,92
Leucina x Valina		0,75	0,65	0,20	0,16

¹Valores expressos em unidades arbitrárias (UA)

SEM= Erro padrão da média

A suplementação de leucina não afetou ($P > 0,05$) a expressão do RNAm do gene eEF2 no músculo *pectoralis major* dos frangos. O eEF2 é essencial para que ocorra a alongação da tradução. Conforme Proud (2002), a ativação do eEF2 é regulada através do mTOR. Apesar de alguns pesquisadores reportarem aumento da fosforilação do mTOR com a suplementação de leucina, não há evidências da influência deste aminoácido na atividade da proteína eEF2 (Deldicque et al., 2007; Wilson et al., 2010), conseqüentemente, a leucina poderia estimular a síntese proteica ativando apenas os fatores da iniciação da tradução, sem influenciar os fatores da alongação.

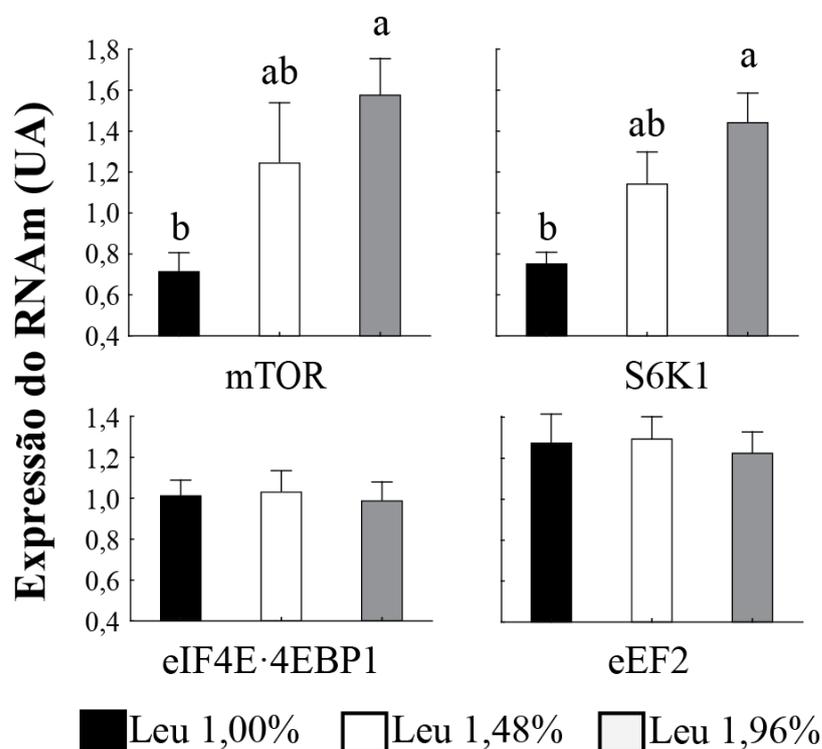


Figura 2. Expressão de RNAm do mTOR, S6K1, eIF4E·4EBP1 e eEF2 no músculo *pectoralis major* de frangos de corte suplementados com leucina (experimento I). ^{ab}Médias com letras diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); UA= unidades arbitrárias.

Apesar de que o nível dietético de leucina de 1,96% estimulou a expressão dos genes envolvidos na via de sinalização do mTOR no músculo *pectoralis major*, esta resposta pode não repercutir em resultados positivos sobre o desempenho das aves, pelo contrário, a taxa de crescimento das aves decresceu em um experimento prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, utilizando as mesmas dietas experimentais (artigo 1). O menor ganho peso dessas aves indica que a síntese proteica muscular não ocorreu de forma eficiente, mesmo com a ativação da via mTOR.

Sabe-se que todos os aminoácidos devem estar disponíveis no local da síntese proteica, portanto, o possível aumento do catabolismo da isoleucina e valina em resposta aos altos níveis de leucina na dieta, pode reduzir os níveis plasmáticos desses aminoácidos, diminuindo assim, a síntese proteica muscular e, conseqüentemente, o desempenho das aves. Contudo, a suplementação de leucina não só reduz os níveis circulantes dos outros dois BCAA, mas também pode reduzir as concentrações sanguíneas dos demais aminoácidos essenciais ao estimular a síntese de proteínas nas células, aumentando deste modo, a captação de aminoácidos pelos tecidos. Estudos realizados com suínos, ratos e humanos corroboram essa afirmação (Zhang et al., 2007;

Zhang et al., 2011; Cervantes-Ramírez et al., 2013), uma vez que estes estudos evidenciaram redução no perfil plasmático de vários aminoácidos em dietas suplementadas com leucina.

Embora a suplementação de leucina ative de forma contínua a via de sinalização do mTOR, a síntese de proteínas no músculo não é mantida durante períodos prolongados, devido à diminuição dos níveis circulantes de aminoácidos (Escobar et al., 2005). Deste modo, o desbalanço no perfil aminoacídico na corrente sanguínea induzida pelo excesso de leucina pode ser o fator limitante para a otimização do desempenho das aves suplementadas com este aminoácido. Outro fator limitante a ser considerado é o nível energético da dieta, pois a suplementação de leucina na dieta poderia aumentar a exigência de energia das aves. A leucina estimula síntese proteica, processo que requer, além de aminoácidos, uma quantidade importante de energia, representando em torno de 20-28% do total do gasto energético da ave (Muramatsu & Okumura, 1985).

A diminuição do desempenho em animais suplementados com leucina deve-se também, em parte, a redução no consumo ração (Calvert et al., 1982). Cota et al. (2006) mostraram que administração de leucina no cérebro de ratos diminui a ingestão de alimentos ao ativar a via de sinalização do mTOR no hipotálamo. Nas aves, ainda desconhece-se se a inclusão de leucina na dieta (via oral) pode chegar a aumentar a atividade no mTOR no hipotálamo em resposta a altos níveis de leucina no cérebro.

A adição de valina na dieta não influenciou ($P > 0,05$) a expressão dos genes estudados, indicando que a valina não pode estimular de forma direta a expressão dos genes envolvidos na tradução do RNAm a proteína no tecido muscular, servindo apenas como substrato na síntese de proteínas.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre as concentrações de cálcio, fósforo e cinza, o diâmetro e índice de Seedor da tíbia dos frangos aos 21 e 42 dias de idade (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Concentrações de cálcio, fósforo e cinza na tibia desengordurada de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 dias (experimento II) e 42 dias de idade (experimento III).

Tratamento	Cálcio (%)		Fósforo (%)		Cinza (%)	
Leucina (%)	-----21 d-----					
1,00	18,95		6,62		45,66	
1,24	19,49		7,17		46,49	
1,48	19,57		6,71		45,90	
1,72	19,26		6,60		47,66	
1,96	18,95		6,90		46,15	
Valina (%)	-----21 d-----					
0,60	19,78		6,86		47,6	
0,75	19,77		6,66		45,9	
0,90	19,04		7,03		47,0	
1,05	18,63		6,63		44,5	
1,20	19,11		6,82		46,9	
SEM	0,28		0,06		0,44	
Leucina (%)	-----42 d-----					
1,00	20,18		6,69		43,68	
1,20	19,96		6,48		42,42	
1,40	20,97		7,76		42,40	
1,60	21,25		6,89		41,40	
1,80	21,04		7,01		42,63	
Valina (%)	-----42 d-----					
0,52	19,94		6,87		42,96	
0,67	21,36		6,92		42,96	
0,82	21,32		6,96		42,84	
0,97	20,13		7,02		40,61	
1,12	20,72		7,07		42,95	
SEM	0,28		0,10		0,34	
Anova	-----P-Valor-----					
	21 d	42 d	21 d	42 d	21 d	42 d
Leucina linear	0,91	0,14	0,97	0,15	0,49	0,23
Leucina quadrática	0,37	0,74	0,78	0,09	0,54	0,15
Valina linear	0,19	0,94	0,82	0,50	0,36	0,31
Valina quadrática	0,57	0,25	0,99	0,98	0,22	0,29
Leucina x valina	0,11	0,17	0,26	0,60	0,42	0,65

Tabela 5. Diâmetro, índice de Seedor e resistência óssea da tíbia de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de leucina e valina digestíveis aos 21 (experimento II) e 42 dias de idade (experimento III).

Tratamento	Diâmetro (mm)		Índice de Seedor		Resistência Óssea (Kgf)	
Leucina (%)	-----21 d-----					
1,00	5,63		85,23		17,85	
1,24	5,31		81,91		19,64	
1,48	5,45		81,27		20,09	
1,72	5,41		80,72		20,48	
1,96	5,22		82,00		17,19	
Valina (%)						
0,60	5,57		85,89		17,07	
0,75	5,21		82,53		18,87	
0,90	5,24		85,46		21,09	
1,05	5,61		75,17		19,50	
1,20	5,39		82,09		18,71	
SEM	0,07		1,31		0,51	
Leucina (%)	-----42 d-----					
1,00	8,94		206,89		37,76	
1,20	8,55		205,82		42,47	
1,40	8,52		198,97		41,51	
1,60	9,24		205,34		39,04	
1,80	8,33		203,04		42,03	
Valina (%)						
0,52	8,51		191,98		39,00	
0,67	8,79		211,09		40,65	
0,82	8,85		206,46		42,21	
0,97	8,49		203,51		39,57	
1,12	8,94		207,04		41,38	
SEM	0,09		2,16		0,79	
Anova	-----P-Valor-----					
	21 d	42 d	21 d	42 d	21 d	42 d
Leucina linear	0,12	0,42	0,41	0,60	0,88	0,38
Leucina quadrática	0,88	0,70	0,40	0,55	0,01	0,45
Valina linear	0,95	0,39	0,11	0,13	0,25	0,52
Valina quadrática	0,24	0,89	0,51	0,11	0,03	0,58
Leucina x valina	0,10	0,62	0,76	0,48	0,06	0,73

Foi observada interação ($P \leq 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis para a resistência óssea da tíbia dos frangos de corte aos 21 dias (Figura 3), mas não aos 42 dias de idade ($P > 0,05$). Conforme a equação ajustada ($RO = -16,097 + 27,139*Leu - 12,672*Leu^2 + 37,304*Val - 28,563*Val^2 + 11,297*LeuVal$; $R^2 = 0,89$), a maior

resistência óssea foi estimada nos níveis de leucina e valina digestíveis de 1,42 e 0,90%, respectivamente. Esta interação indica que relações adequadas entre estes aminoácidos podem ser essenciais para promover o ótimo desenvolvimento do tecido ósseo das aves na fase inicial (1-21 dias), resultando em ossos com maior resistência. Relações inadequadas de BCAA podem reduzir a atividade dos osteoblastos, resultando em aves com problemas de pernas (Farran & Thomas, 1992).

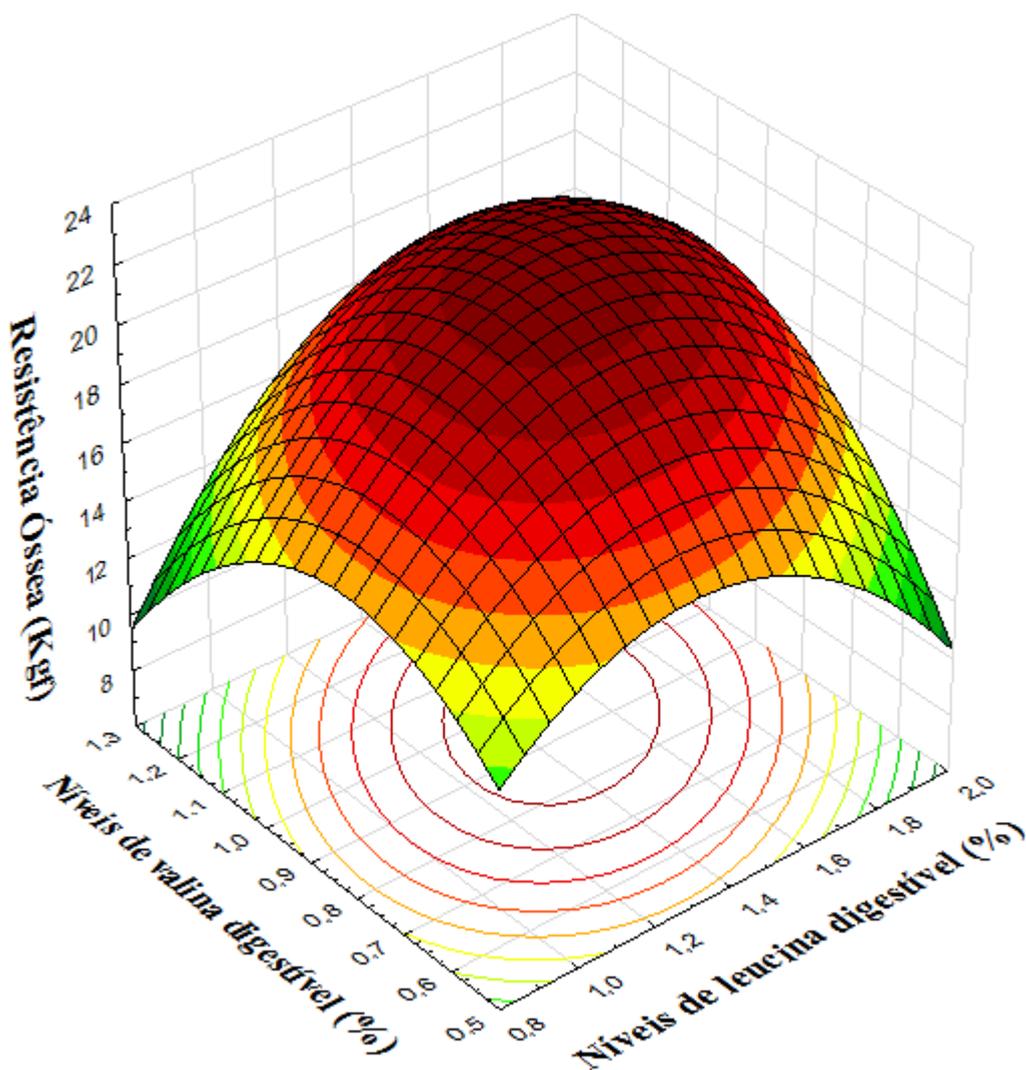


Figura 3. Efeito dos níveis de leucina e valina digestíveis sobre a resistência óssea da tíbia de frangos de corte na fase de 1 - 21 dias de idade.

A suplementação de leucina e valina pode ter aumentado a resistência óssea atuando sobre os componentes da matriz orgânica óssea, sem influenciar os componentes inorgânicos, visto que os níveis de leucina e valina não afetaram ($P > 0,05$) as concentrações de cálcio, fósforo e cinza da tíbia das aves aos 21 e 42 dias de idade.

A proporção orgânica da matriz óssea é constituída por grande quantidade de fibras colágenas de tipo I e de glicoproteínas e proteoglicanos. Os proteoglicanos desempenham um papel importante na organização da matriz extracelular óssea, participando da estruturação do próprio tecido como reguladores ativos da formação das fibras de colágeno (Lamoureux et al., 2007). Além disso, os proteoglicanos têm a função de dar rigidez à matriz óssea, proporcionando-lhe resistência à compressão e preenchendo espaços (Baud'Huin et al., 2012). Dentre as famílias de proteoglicanos presentes na matriz óssea, os pequenos proteoglicanos ricos em leucina são os mais abundantes (Lamoureux et al., 2007).

Rostagno et al. (2011) recomendam exigências de leucina e valina digestíveis de 1,26 e 0,90% para maximizar o desempenho de frangos de corte na fase de 8-21 dias. Deste modo, a necessidade de leucina para aumentar a resistência óssea pode ser maior (1,42%) que os níveis requeridos para otimizar os parâmetros produtivos das aves.

As áreas das zonas da placa de crescimento tem sido utilizadas para estudar a incidência de discondroplasia tibial nos frangos de corte (Murakami et al., 2001; Oviedo-Rondón et al., 2001; Murakami et al., 2003). A suplementação de leucina reduziu linearmente ($P < 0,05$) a área da zona de cartilagem hipertrófica ($ZCH = 45,883 - 8,1797*Leu$; $R^2 = 0,76$) da tíbia dos frangos aos 21 dias de idade (Tabela 6), sendo a principal região afetada na discondroplasia tibial (Oviedo-Rondón et al., 2001).

A interrupção da diferenciação dos condrócitos da placa epifisária das aves, resulta em um acúmulo de condrócitos pré-hipertróficos imaturos, ocasionando o aparecimento da discondroplasia tibial (Praul et al., 2000), caracterizada por uma camada de cartilagem não calcificada, opaca e avascular (Farquharson & Jefferies, 2000).

A restrição de leucina em ratos demonstrou reduzir a proliferação e diferenciação dos condrócitos na placa de crescimento ao diminuir a atividade do mTOR (Phornphutku et al., 2008; Kim et al., 2009), proteína importante na modulação do crescimento do tecido ósseo (Phornphutku et al., 2008). Deste modo, a suplementação de leucina pode ter reduzido a área da zona de cartilagem hipertrófica da tíbia ao favorecer a diferenciação dos condrócitos das aves via mTOR.

Tabela 6. Áreas da placa de crescimento (A1), da zona de cartilagem hipertrófica (A2) e total da epífise tibial (A3) e diâmetro da fibra muscular do músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com leucina e valina aos 21 (experimento II) e 42 dias de idade (experimento III).

Tratamento	Áreas da placa de crescimento (mm ²)			Diâmetro da fibra do <i>Pectoralis major</i> (µm)				
	A1	A2	A3					
-----21 d-----								
Leucina (%)								
1,00	17,72	37,76	90,69	30,50				
1,24	17,10	36,50	92,74	31,75				
1,48	18,14	33,86	84,77	31,90				
1,72	18,71	32,43	88,55	30,25				
1,96	17,55	31,62	86,28	29,75				
Valina (%)								
0,60	16,58	30,86	81,94	29,66				
0,75	18,51	35,33	94,05	29,96				
0,90	18,48	35,26	88,31	31,09				
1,05	17,60	36,93	90,45	32,47				
1,20	18,00	33,79	88,30	30,96				
SEM	0,30	1,20	1,69	0,37				
-----42 d-----								
Leucina (%)								
1,00	23,73	39,80	126,57	46,87				
1,20	23,53	37,65	118,66	47,00				
1,40	22,61	37,70	119,37	48,20				
1,60	24,12	41,33	121,76	46,82				
1,80	22,83	49,62	133,82	44,34				
Valina (%)								
0,52	22,79	41,50	123,99	47,03				
0,67	21,33	43,70	123,75	46,50				
0,82	23,26	42,48	121,62	45,67				
0,97	25,01	35,44	122,86	47,45				
1,12	24,41	42,99	127,97	46,59				
SEM	0,52	2,25	2,79	0,40				
Anova	-----P-Valor-----							
	21 d	42 d	21 d	42 d	21 d	42 d	21 d	42 d
Leucina linear	0,45	0,75	0,04	0,15	0,59	0,38	0,23	0,06
Leucina quadrática	0,52	0,96	0,21	0,20	0,79	0,10	0,07	0,02
Valina linear	0,09	0,11	0,36	0,74	0,20	0,72	0,04	0,98
Valina quadrática	0,10	0,72	0,44	0,79	0,14	0,55	0,25	0,54
Leucina x valina	0,26	0,53	0,35	0,95	0,63	0,96	0,10	0,27

Os níveis de leucina e valina influenciaram alguns parâmetros ósseos na fase inicial, mas nenhum no período de crescimento (21-42 d), indicando que estes aminoácidos

podem ser importante apenas para o período de 1-21 dias. A fase inicial é um período crítico para o desenvolvimento dos ossos (Yair et al., 2012), pois a estrutura óssea ainda não está totalmente formada nesta fase, processo que inicia desde a incubação (Oviedo-Rondón et al., 2006).

Não foi observada interação ($P > 0,05$) entre os níveis de leucina e valina digestíveis sobre o diâmetro da fibra muscular do músculo *pectoralis major* aos 21 e 42 dias de idade. No entanto, houve efeito quadrático dos níveis de leucina digestíveis sobre o diâmetro da fibra muscular do músculo *pectoralis major* aos 21 ($P \leq 0,07$) e 42 ($P < 0,05$) dias de idade, sendo estimado o maior diâmetro com 1,32 e 1,24% de leucina digestível aos 21 ($FM = 19,038 + 18,205*Leu - 6,5724*Leu^2$; $R^2 = 0,69$) e 42 dias de idade ($FM = 24,091 + 36,438*Leu - 13,95*Leu^2$; $R^2 = 0,71$), respectivamente.

Níveis de leucina acima dos estimados reduziram o diâmetro das fibras musculares nas duas fases, corroborando a afirmação prévia de que a síntese proteica muscular não ocorreu de forma eficiente nas aves que receberam altos níveis de leucina, mesmo com a maior expressão do gene mTOR, possivelmente, pela leucina aumentar o catabolismo da isoleucina e valina.

A suplementação de leucina aumentou linearmente ($P < 0,05$) o diâmetro das fibras musculares do músculo *pectoralis major* aos 21 dias ($FM = 27,772 + 3,3973*Val$; $R^2 = 0,75$), mas não aos 42 dias de idade ($P > 0,05$).

CONCLUSÃO

A suplementação de leucina estimula a expressão do RNAm dos genes mTOR e S6K1 no músculo *pectoralis major* dos frangos de corte na fase inicial, e portanto, pode influenciar a expressão gênica dos fatores da iniciação da tradução no tecido muscular das aves.

A suplementação de leucina e valina interagem positivamente sobre a resistência óssea dos frangos de corte aos 21 dias de idade.

REFERÊNCIAS

- AOAC. 2006. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Ashmore, C. R., G. Tompkins, L. Doerr. 1972. Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. *Anim. Sci. J.* 34:37-41.
- Baud'Huin, M., C. Charrier, G. Bougras, R. Brion, F. Lezot, M. Padrines, D. Heymann. 2012. Proteoglycans and osteolysis. *Methods Mol. Biol.* 836:323-37.
- Beçak, W., J. Paulete. 196. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 305p.
- Bigot, K., M. Taouis, S. Tesseraud. 2003. Refeeding and insulin regulate S6K1 activity in chicken skeletal muscles. *J. Nutr.* 133:369–373.
- Calvert, C. C., K. C. Klasing, and R. E. Austic. 1982. Involvement of food intake and amino acid catabolism in the branched-chain amino acid antagonism in chicks. *J. Nutr.* 112:627–635.
- Cervantes-Ramírez, M., V. Mendez-Trujillo, B. A. Araiza-Piña, M. A. Barrera-Silva, D. González-Mendoza, A. Morales-Trejo. 2013. Supplemental leucine and isoleucine affect expression of cationic amino acid transporters and myosin, serum concentration of amino acids, and growth performance of pigs. *Genet. Mol. Res.* 12(1):115-26.
- Cota, D., K. Proulx, K. A. Blake Smith, S. C. Kozma, G. Thomas, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 312:927–930.
- Crozier, S. J., S. R. Kimball, S. W. Emmert, J. C. Anthony, L. S. Jefferson. 2005. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 135:376-382.
- Deldicque, L., C. Sanchez Canedo, S. Horman, I. De Potter, L. Bertrand, L. Hue, M. Francaux. 2008. Antagonistic effects of leucine and glutamine on the mTOR pathway in myogenic C2C12 cells. *Amino Acids.* 35:147-155.
- Dubowitz, V., M. Brooke. 1984. Muscle biopsy: a modern approach. London: W.B. Saunders, 472p.
- Escobar, J., J. W. Frank, A. Suryawan, H. V. Nguyen, S. R. Kimball, L. S. Jefferson, and T. A. Davis. 2005. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288:E914–E921.
- Escobar, J., J. W. Frank, A. Suryawan, H. V. Nguyen, C. G. Van Horn, S. M. Hutson, and T. A. Davis. 2010. Leucine and α -ketoisocaproic acid, but not norleucine, stimulate skeletal muscle protein synthesis in neonatal pigs. *J. Nutr.* 140:1418–1424.
- Everaert, N., Q. Swennen, S. M. Coustard, H. Willemsen, C. Careghi, J. Buyse, V. Bruggeman, E. Decuypere, S. Tesseraud. 2010. The effect of the protein level in a pre-starter diet on the post-hatch performance and activation of ribosomal protein S6 kinase in muscle of neonatal broilers. *Br. J. Nutr.* 103:206-211.
- Farran, M. T., O. P. Thomas. 1992. Valine deficiency. 2. The effect of feeding a valine-deficient diet during the starter period on performance and leg abnormality of male broiler chicks. *Poult. Sci.* 71(11):1885-90.
- Farquharson, C., D. Jeffereis. 2000. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* 79:994-1004.
- Fernandes M. I., E. J. Gaio, C. K. Rosing, R. V. Oppermann, P. V. Rado. 2007. Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. *Braz. Oral Res.* 21:134-139.

- Gilbert E. R., H. Li, D. A. Emmerson, K. E. Jr Webb, E. A. Wong. 2007. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA in the small intestine of broiler chicks. *Poult Sci.* 86:1739–53.
- Gingras, A. C., B. Raught, S. P. Gygi, A. Niedzwiecka, M. Miron, S. K. Burley, R. D. Polakiewicz, A. Wyslouch-Cieszynska, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* 15:2852-2864.
- Glynn, E. L., C. S. Fry, M. J. Drummond, K. L. Timmerman, S. Dhanani, E. Volpi, B. B. Rasmussen. 2010. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J. Nutr.* 140:1970-1976.
- Knowles T. G., S. C. Kestin, S. M. Haslam, S. N. Brown, L. E. Green, A. Butterworth, S. J. Pope, D. Pfeiffer, C. J. Nicol. 2008. Leg disorders in broiler chickens: Prevalence, risk factors and prevention. *PLoS One.* 3:e1545.
- Lamoureux, F., M. Baud'huin, L. Duplomb, D. Heymann, F. Rédini. 2007. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays.* 29:758–771.
- Leach R. M. Jr., and E. Monsonego-Ornan. 2007. Tibial dyschondroplasia 40 years later. *Poult. Sci.* 86:2053-2058.
- Lee, J. 2012. Molecular basis of feed efficiency in meat-type chickens. PhD Diss. Univ. Georgia. Athens, Georgia.
- Murakami, A. E., E. O. Oviedo-Rondón, E. N. Martins, M. S. Pereira, and C. Scapinello. 2001. Sodium and chloride requirements of growing broiler chickens (twenty-one to forty-two days of age) fed corn-soybean diets. *Poult. Sci.* 80:289–294.
- Murakami, A. E., J. R. G. Franco, E. N. Martins, E. O. Oviedo Rondon, M. I. Sakamoto, and M. S. Pereira. 2003. Effect of electrolyte balance in low- protein diets on broiler performance and tibial dyschondroplasia incidence. *J. Appl. Poult. Res.* 12:207-216.
- Muramatsu T., and J. Okumura. 1985. Whole body protein turnover in chicks at early stage of growth. *J. Nutr.* 57:483-490.
- Lynch, C. J., B. J. Patson, J. Anthony, A. Vaval, L. S. Jefferson, T. C. Vary. 2002. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 283:E503-13.
- Oliveira, A. F. G. 2006. Estudo do padrão de crescimento ósseo em frangos de corte dediferentes grupos genéticos criados em duas densidades populacionais. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Oviedo-Rondón, E. O., A. E. Murakami, A. C. Furlan, I. Moreira, and M. Macari. 2001. Sodium and chloride requirements of young broiler chickens fed corn-soybean diets (one to twenty one days of age). *Poult. Sci.* 80:592–598.
- Oviedo-Rondón, E. O., P. R. Ferket, and G. B. Havenstein. 2006. Understanding long bone development in broilers and turkeys. *Avian Poult. Biol. Rev.* 17:77–88.
- Praul, C. A., B. C. Ford, C. C. Gay, M. Pines, R. M. Leach. 2000. Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* 79:1009-1013.
- Proud, C. G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* 269:5338-5349.
- Pullen, A. H. 1977. The distribution and relative size of fiber type in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat.* 123:467-86.
- Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poult. Sci.* 86:1478–1490.
- Richards, M. P., R. W. Rosebrough, C. N. Coon, J. P. Mcmurtry. 2010. Feed intake regulation for the female broiler breeder: In theory and in practice. *J. Appl. Poult. Res.* 19:182-193.

- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. de Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Brazilian tables for poultry and swine: feed composition and nutritional requirements. 3rd ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- SAS Institute. 2009. SAS Proprietary Software, Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Seedor, J. G., H. A. Quartuccio, and D. D. Thompson. 1991. The biophosphonate alendronate (MK – 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res.* 6:339-346.
- Shimomura, Y., Harris, R.A. 2006. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. *J. Nutr.* 136:232S–233S.
- Silva, D. J. and A. C. D. Queiróz. 2004. Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa:UFV, 235p.
- Suryawan, A., A. S. Jeyapalan, R. A. Orellana, F. A. Wilson, H. V. Nguyen, and T. A. Davis. 2008. Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:E868–E875.
- Suryawan, A., R. M. Torrazza, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, M. L. Fiorotto, S. W. El-Kadi, N. Srivastava, H. V. Nguyen, T. A. Davis. 2012. Enteral leucine supplementation increases protein synthesis in skeletal and cardiac muscles and visceral tissues of neonatal pigs through mTORC1-dependent pathways. *Pediatr. Res.* 71(401):324-31.
- Tesseraud, S., K. Bigot, and M. Taouis. 2003. Amino acid availability regulates S6K1 and protein synthesis in avian insulin-intensive QM7 myoblasts. *FEBS Letters.* 540:176–180.
- Thorp, B. H., B. Ducro, and C. C. Whitehead. 1993. Avian tibial dyschondroplasia: The interaction of genetic selection and dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Avian Pathol.* 22:311–324.
- Torrazza R. M., A. Suryawan, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, J. W. Frank, H. V. Nguyen, M. L. Fiorotto, S. El-Kadi, T. A. Davis. 2010. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *J. Nutr.* 140:2145–52.
- Wang, X., and C. G. Proud. 2008. A Novel Mechanism for the Control of Translation Initiation by Amino Acids, Mediated by Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2B. *Mol. Cell Biol.* 28(5): 1429–1442.
- Wilson, F. A., A. Suryawan, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, H. V. Nguyen, and T. A. Davis. 2010. Stimulation of muscle protein synthesis by prolonged parenteral infusion of leucine is dependent on amino acid availability in neonatal pigs. *J. Nutr.* 140:264–270.
- Yair R., Z. Uni, and R. Shahar. 2012. Bone characteristics of late term embryonic and hatchling broilers: Bone development under extreme growth rate. *Poult. Sci.* 91:2614-20.
- Zhang, Y., K. Guo, R. E. LeBlanc, D. Loh, G. J. Schwartz, Y. H. Yu. 2007. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes.* 56:1647–1654.
- Zhang Y, H. Kobayashi, K. Mawatari, J. Sato, G. Bajotto, Y. Kitaura, Y. Shimomura. 2011. Effects of branched-chain amino acid supplementation on plasma concentrations of free amino acids, insulin, and energy substrates in young men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 57(1):114-7.

VI- CONSIDERAÇÃO FINAIS

Dietas com redução da PB nem sempre resultam em aves com desempenho semelhante ao proporcionado por dietas com proteína adequada. Possivelmente, o desbalanço nos níveis de BCAA poderia ser uma das causas da queda do desempenho de aves alimentadas com dietas com baixa proteína. Dietas nas quais aumenta a proporção do milho, sendo a proteína deste ingrediente desproporcionalmente elevada em leucina em relação à valina e isoleucina, situação que pode potencializar o efeito antagônico da leucina sobre os outros dois BCAA.

No presente estudo, evidenciou-se que altos níveis de leucina em dietas com baixa proteína prejudica o desempenho das aves, principalmente, quando há níveis deficientes de valina. Daqui decorre a importância de manter relações adequadas entre estes aminoácidos (relação valina:leucina digestível) na tentativa de evitar reduções dos parâmetros produtivos das aves. Nesse contexto, relações de valina:leucina digestíveis de 0,71 e 0,72 foram estimadas para otimizar o desempenho dos frangos de corte alimentados com dietas com baixa proteína na fase inicial e de crescimento, respectivamente.

Existe ainda discrepâncias na literatura sobre as exigências de leucina e valina digestíveis nas diferentes fases criação das aves, reforçando a necessidade de constantes atualizações das exigências de aminoácidos para os frangos de corte.

Considerando que as exigências dos BCAA são influenciadas pelo antagonismo existente entre estes, existe a necessidade de estudar as exigências de leucina, valina e isoleucina em conjunto, em um mesmo experimento. A metodologia de superfície resposta de Box & Wilson (1951) (Central Composite Design) permite a realização deste tipo de experimento, sem necessidade de um número exageradamente grande observações.

Com a viabilidade econômica da suplementação de um maior número de aminoácidos no futuro, a suplementação de BCAA pode tornar-se uma estratégia interessante a ser adotada pela indústria para aumentar a síntese proteica e diminuir o teor de gordura da carcaça das aves, visto que seu principal objetivo é fornecer proteínas de alta qualidade para os animais e, assim suprir com proteína de alta qualidade à alimentação humana.