

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS NO
CORACÃO DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO
ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Autora: Kariny Ferreira Moreira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS NO
CORACÃO DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO
ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

Autora: Kariny Ferreira Moreira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2019

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

M838a Moreira, Kariny Ferreira
Alterações bioquímicas e morfológicas no coração
de frangos de corte submetidos ao estresse térmico
agudo / Kariny Ferreira Moreira. -- Maringá, 2019.
83 f. : il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, 2019.

1. Frango de corte - Estresse térmico - Células
cardíacas. 2. Frango de corte - Metionina. 3.
Estresse oxidativo. 4. Apoptose. I. Gasparino,
Eliane, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 636.513

Síntique Raquel de C. Eleutério - CRB 9/1641




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS
NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS
AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO

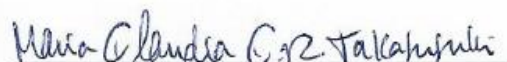
Autora: Kariny Ferreira Moreira
Orientadora: Profª Drª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 13 de fevereiro de 2019.


Profª Drª Simara Márcia Marcato


Profª Drª Carmem Patricia
Barbosa


Profª Drª Maria Claudia Colla
Ruvolo Takasusuki


Profª Drª Stefania Caroline
Claudino da Silva


Profª Drª Eliane Gasparino
Orientadora

“All we need is just a little patience”

Guns n' Roses

Ao meu pai, José Maria Moreira, à minha mãe Regina Célia Ferreira Moreira, minhas irmãs Karoliny Ferreira Moreira e Kamily Ferreira Moreira. À minha segunda família: José Elton de Melo Nascimento, Divaney Mamédio dos Santos e Venício Macedo Carvalho, que me apoiaram e deram forças para que eu superasse as dificuldades.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Santa Rita, por me permitirem todas as coisas e por terem me dado força, coragem e colocado em meu caminho somente pessoas certas que me ajudaram nos momentos mais difíceis.

À Universidade Estadual de Maringá, em especial o Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e ao Departamento de Ciências Fisiológicas por ter tornado possível à realização dos meus estudos e deste projeto.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Prof.^a Eliane Gasparino e coorientadora Prof.^a Ana Paula Del Vesco, pela orientação e ensinamentos, além da confiança, apoio ao longo desta trajetória e por acreditar na minha capacidade e apostar em mim.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM, pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi.

Aos integrantes da banca de defesa, pelas valiosas sugestões que certamente irão enriquecer o presente trabalho.

A Equipe de trabalho Gene Z, Angélica de Souza Khatlab e Fabiana Cristina Belchior de Sousa.

BIOGRAFIA

KARINY FERREIRA MOREIRA, filha de José Maria Moreira e Regina Célia Ferreira Moreira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, Brasil, no dia 05 de janeiro de 1987.

Em abril de 2013, concluiu o curso de graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em abril de 2013, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri, área de concentração Produção Animal, realizando os estudos na área de nutrição de ruminantes, e no dia 12 de agosto de 2015 submeteu-se à banca para a defesa da dissertação.

Em março de 2016, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, na Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal- Melhoramento Genético, sob orientação da Professora Dr^a. Eliane Gasparino.

E no dia 13 de fevereiro de 2019, submeteu-se a banca de defesa do doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
I INTRODUÇÃO.....	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.0. Nutrição em frangos de corte.....	15
1.1. Fisiologia cardíaca das aves em ambiente de estresse térmico...	16
1.2. Estresse oxidativo e sistema enzimático.....	18
1.3. Expressão gênica.....	21
1.3.1. <i>Genes do sistema de defesa celular em resposta ao estresse.....</i>	<i>21</i>
1.3.2. <i>Genes da apoptose.....</i>	<i>23</i>
1.3.3. <i>Enzima conversora de angiotensina (ECA).....</i>	<i>24</i>
1.3.4. <i>Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP).....</i>	<i>25</i>
LITERATURA CITADA.....	25
II OBJETIVO GERAL.....	34
III OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
IV ESTRESSE TÉRMICO AGUDO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE.....	35
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Material e métodos.....	37
Resultados.....	44
Discussão.....	50
Conclusão.....	54
Referências.....	54
V EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO PROCESSO DE APOPTOSE E ANTIOXIDANTES NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIPEPTÍDEO (DL-METIONIL-DL-METIONINA) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO.....	61
Resumo.....	61
Introdução.....	62
Material e métodos.....	63
Resultados.....	66
Discussão.....	71
Conclusão.....	75
Referências.....	75
VI CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84

LISTA DE TABELAS

	Página
IV ESTRESSE TÉRMICO AGUDO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE.....	35
Tabela 1 - Dietas Experimentais.....	38
Tabela 2 - Sequências de primers na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR)	44
Tabela 3 - Morfometria do coração de frangos de cortes aos 42 dias de idade, apresentados como média (desvio-padrão).....	47
V EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO PROCESSO DE APOPTOSE E ANTIOXIDANTES NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIPEPTÍDEO (DL-METIONIL-DL-METIONINA) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO.....	61
Tabela 1 - Planos Nutricionais Experimentais.....	64
Tabela 2 - Sequências de primers na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR)	66
Tabela 3 - Peso corporal e peso relativo do coração de frangos de corte com 45 dias.....	68
Tabela 4 - Morfometria do coração de frangos de cortes com 45 dias de idade.....	69
Tabela 5 - Expressão dos genes <i>CASP3</i> , <i>BCL 2</i> , <i>BAX</i> , <i>HSP70</i> , <i>SOD</i> e <i>GPX3</i> no coração de frangos de corte aos 45 dias de idade.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
I INTRODUÇÃO.....	14
Figura 1 - Sistemas antioxidantes do tipo enzimático.....	18
Figura 2 - Mecanismo de proteção celular das HSPs.....	22
IV ESTRESSE TÉRMICO AGUDO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE.....	35
Figura 1- Temperatura Corporal aferida por via probe e retal em condições de conforto e estresse térmico.....	45
Figura 2 - Temperaturas corporais dos frangos de corte aos 42 dias submetido ao ambiente de conforto e estresse térmico considerando as vias de aferição por probe ou retal pelo período de 12 horas ininterruptas.....	45
Figura 3 - Fotomicrografias de artérias aortas. Imagens utilizadas para as análises morfométricas.....	48
Figura 4 - Ensaios bioquímicos.....	49
Figura 5 - Expressão dos genes Superóxido dismutase (<i>SOD</i>), glutathione peroxidase (<i>GPX3</i>), óxido nítrico sintase induzida (<i>iNOS</i>), enzima conversora de angiotensina (<i>ECA</i>) e proteína de transferência de colesterol esterificado (<i>CETP</i>) no coração de frangos de corte aos 42 dias de idade.....	50
V EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO PROCESSO DE APOPTOSE E ANTIOXIDANTES NO CORAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIPEPTÍDEO (DL-METIONIL-DL-METIONINA) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO.....	61
Figura 1- Consumo de ração e ganho de peso médio diário de frangos de corte no período de 1-45 dias mantidos em conforto térmico e submetidos a 24 horas de estresse térmico.....	67

RESUMO

O melhoramento genético do frango de corte (*Gallus gallus*) proporcionou grande avanço em seu processo de deposição de tecido muscular possibilitando excelentes índices zootécnicos. No entanto, não houve melhorias semelhantes no sistema cardiovascular, fazendo com que o acelerado aumento da massa muscular tornasse os animais suscetíveis ao desenvolvimento de transtornos metabólicos, em decorrência do desajuste entre o pequeno tamanho do coração em relação ao seu peso vivo, que os tornam suscetíveis à insuficiência cardíaca por diferentes fatores. O objetivo do **Artigo I**, foi avaliar os efeitos do estresse térmico agudo (32°C; 12 horas) em frangos de corte sobre a temperatura corporal por meio de dois métodos de mensuração, via retal e por probe, aspectos morfométricos do coração e da artéria aorta, e a expressão dos genes: óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*), enzima conversora de angiotensina (*ECA*), proteína de transferência de colesterol esterificado (*CETP*), superóxido dismutase (*SOD*) e glutathione peroxidase 3 (*GPX3*), assim como avaliar os parâmetros inflamatórios (mieloperoxidase e N-acetil-glicosaminidase), parâmetros de estresse oxidativo (grupos sulfidrílicos não proteicos, atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, níveis de glutathione S-transferase, hidroperóxidos lipídicos e espécies reativas de oxigênio) e níveis de nitrito no tecido cardíaco. Foram utilizados 36 frangos de corte em delineamento inteiramente casualizado, distribuídos em dois grupos: ambiente de conforto térmico (18°C) e ambiente de estresse térmico (32°C). O estresse térmico desencadeou alteração na temperatura corporal independentemente da via de aferição via probe e por via retal. Houve efeito significativo na espessura da parede da artéria aorta e nos diâmetros látero lateral e ântero posterior ($P < 0,05$), da mesma forma houve diferença nas dosagens de hidroperóxidos lipídicos, na quantificação das espécies reativas de oxigênio e na dosagem de nitrito ($P < 0,05$). As quantificações dos genes *iNOS*, *ECA* e *CETP* também foram significativas com maior expressão nos animais submetidos ao estresse por calor. Assim, pode-se concluir que o estresse térmico agudo (32°C; 12 horas) foi capaz de promover diversas alterações

morfológicas e moleculares no coração e na artéria aorta de frangos de corte e essas alterações podem ser parcialmente responsáveis por casos de mortes súbitas em plantéis de frangos de corte criados em condições de estresse térmico por calor. No **Artigo II**, o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de dipeptídeos de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina) em dietas de frangos de corte e verificar os seus efeitos sobre a expressão do gene da proteína do choque térmico 70 kDa (*HSP70*), dos genes de sinalização da apoptose caspase 3 (*CASP3*), célula-B de linfoma 2 (*BCL2*), proteína X associada ao BCL2 (*BAX*), genes do sistema antioxidante, superóxido dismutase (*SOD*) e a glutatona peroxidase 3 (*GPX3*) e a morfometria do coração em condições de estresse térmico agudo (38°C; 24 horas). Foram utilizados 90 frangos de corte distribuídos em esquema fatorial 3x2: três tratamentos relacionados à suplementação de metionina: SM, DL-Met e DL-MMet e dois ambientes ambiente de conforto térmico e de estresse por calor. O estresse por calor desencadeou significativamente ($P<0,05$) a sinalização da apoptose havendo efeito de interação entre dieta e ambiente ($P<0,05$) para a expressão dos genes *BCL2* e *BAX*, que resultou em efeito protetor para as células cardíacas. Houve efeito de interação entre dieta e ambiente ($P<0,05$) sobre a expressão dos genes do sistema antioxidante *GPX3* e *SOD*. Em relação à morfometria do coração houve efeito de interação ($P<0,05$) entre dieta e ambiente para as medidas relacionadas à espessura dos músculos ventriculares direito, esquerdo e espaços interventriculares. A suplementação de metionina na forma de DL-metionina e DL-Metionil-DL-Metionina proporcionou melhor desempenho das aves, atenuou a perda de peso em situações de estresse térmico e foi responsável por tornar os mecanismos de proteção cardíacas mais eficientes em situação de elevada temperatura.

Palavras-chave: apoptose, avicultura, células cardíacas, nutrigenômica.

ABSTRACT

The genetic improvement of broiler chickens (*Gallus gallus*) provided a great advance in the process of deposition of muscle tissue, allowing excellent zootechnical indexes. However, there were no similar improvements in the cardiovascular system, causing the accelerated increase in muscle mass to make the animals susceptible to the development of metabolic disorders, due to the mismatch between the small size of the heart in relation to its live weight, which make them susceptible to heart failure due to different factors. The objective of **Article I**, the objective of this study was to evaluate the effects of acute thermal stress (32° C; 12 hours) on broilers on body temperature by means of two methods of measurement, rectal and probe, morphometric aspects of the heart and (*iNOS*), angiotensin converting enzyme (*ACE*), esterified cholesterol transfer protein (*CETP*), superoxide dismutase (*SOD*), and glutathione peroxidase (*GPX3*), as well as the expression of the genes: nitric oxide synthase (*iNOS*), angiotensin converting enzyme oxidative stress parameters (non-protein sulfhydryl groups, activity of catalase and superoxide dismutase enzymes, glutathione S-transferase levels, lipid hydroperoxides and reactive oxygen species), and levels of inflammatory parameters (myeloperoxidase and N-acetyl glycosaminidase). nitrite in cardiac tissue. Thirty - six broilers were used in a completely randomized design, distributed in two groups: thermal comfort environment (18°C) and thermal stress environment (32°C). Thermal stress triggered changes in body temperature regardless of the probe and rectal route. There was a significant effect on the thickness of the aortic artery wall and on the lateral and posterior posterior diameters (P<0.05). There was also a difference in lipid hydroperoxide dosages, in the quantification of reactive oxygen species and in the nitrite dosage (P<0.05). The quantifications of the *iNOS*, *ACE* and *CETP* genes were also significant with greater expression in the animals submitted to heat stress. Thus, it

can be concluded that the acute thermal stress (32°C, 12 hours) was able to promote several morphological and molecular changes in the heart and the aorta artery of broiler chickens and these alterations may be partially responsible for cases of sudden death in of broilers raised under heat stress conditions. **Article II**, was to evaluate the use of methionine dipeptides (DL-Methionyl-DL-Methionine) in broiler diets and to verify their effects on expression of the 70 kDa heat shock protein (*HSP70*) gene, (*BCL2*), BCL2-associated X-protein (*BAX*), antioxidant system genes, superoxide dismutase (*SOD*) and glutathione peroxidase 3 (*GPX3*) and the genes for signaling apoptosis caspase 3 (*CASP3*), B-cell lymphoma 2 (*BCL2*) morphometry of the heart under conditions of acute thermal stress (38° C, 24 hours). A total of 90 broilers distributed in a 3x2 factorial scheme were used: three treatments related to methionine supplementation: SM, DL-Met and DL-MMet, and two environments of thermal comfort and heat stress. Heat stress triggered significantly ($P < 0.05$) the signaling of apoptosis, with interaction effect between diet and environment ($P < 0.05$) for the expression of the *BCL2* and *BAX* genes, which resulted in a protective effect for the cells cardiac disorders. There was interaction effect between diet and environment ($P < 0.05$) on the expression of the genes of the antioxidant system *GPX3* and *SOD*. In relation to heart morphometry, there was an interaction effect ($P < 0.05$) between diet and environment for the measurements related to the thickness of the right, left ventricular and interventricular spaces. Methionine supplementation in the form of DL-methionine and DL-methionyl-DL-methionine provided better bird performance, attenuated weight loss in thermal stress situations and was responsible for making cardiac protection mechanisms more efficient in high temperature.

Key words: apoptosis, poultry, cardiac cells, nutrigenomics.

I INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de aves proporcionou grande avanço no crescimento e desenvolvimento de frangos de corte predispondo-os aos excelentes índices zootécnicos, principalmente os relacionados a conversão alimentar, eficiência alimentar, ganho de peso, idade e peso ao abate, índice eficiência produtiva, taxa de mortalidade e viabilidade (Sahraei, 2014). Entretanto, devido ao tamanho desproporcional do coração em relação a massa muscular, o coração desses animais apresenta elevada carga de trabalho, e resulta em animais mais suscetíveis ao desenvolvimento de transtornos metabólicos, com alterações fisiopatológicas e alterações nas atividades enzimáticas devido ao estresse oxidativo causado pelo somatório desses fatores (Kumari *et al.* 2016; Tickle *et al.* 2014).

O Brasil sendo um país de clima tropical, promove vários desafios na avicultura, sendo o fator ambiental o mais relevante, principalmente o fator relacionado a alta temperatura, os quais são limitantes para ótima produtividade (Furlan e Macari 2002).

Porém, para amenizar a propensão dos animais a desenvolverem doenças cardíacas, relacionadas ao estresse térmico e a ineficiência do sistema cardiovascular, a modificação da dieta com utilização de alimentos funcionais baseados em suas funções nutricionais básicas, podem diminuir o risco de doenças crônicas e apresentar benefícios fisiológicos uma vez que a nutrição, desempenha papel importante na etiologia e no tratamento das doenças cardiovasculares por possuir componentes fisiologicamente ativos com ações antioxidantes, que atuam concentrando-se principalmente em fatores de risco estabelecidos, relacionados à síndrome metabólica, hiperlipidemia e níveis elevados de marcadores inflamatórios (Asgary *et al.* 2018).

A metionina é um aminoácido sulfurado essencial necessário para manter o crescimento e outras funções metabólicas, permitindo que o animal expresse seu máximo potencial genético, e é o primeiro limitante em dietas de aves formuladas com base nos alimentos milho e soja. A metionina é suplementada nas dietas geralmente na forma de aminoácidos industriais, DL-metionina e de metionina hidroxí-análoga (MHA). Outra possibilidade é a utilização de dipeptídeos de metionina, que em função de transportadores específicos permite maior velocidade de transporte do dipeptídeo e maior eficiência energética em relação a absorção de aminoácido livre (Gilbert *et al.* 2008).

Assim, a busca por novas fontes de metionina e o conhecimento relacionado aos processos metabólicos, às modificações morfológicas e enzimáticas em nível celular e molecular provocadas pelo estresse térmico no coração se torna cada vez mais importante.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.0. Nutrição em frangos de corte

O fornecimento de dieta balanceada para frangos de corte ocorre de acordo com as exigências de cada fase de desenvolvimento (Rostagno *et al.* 2011), que aliado aos avanços no processo de melhoramento genético, proporcionam excelentes índices zootécnicos e possibilita assim, que as aves expressem o máximo do seu potencial genético (Sahraei 2014).

Na produção industrial avícola, cerca de 70% do custo total de produção está atribuída à alimentação, sendo que as fontes de proteína são as responsáveis pela maior parte desse custo. Dessa forma, o fornecimento de uma dieta balanceada, produzida com alimentos de qualidade, torna-se de suma importância. Do mesmo modo, o importante progresso na nutrição avícola nos últimos anos se deve à formulação das dietas a partir do conceito de proteína ideal e garante o exato balanceamento, de acordo com o perfil de aminoácidos, por meio da redução do desequilíbrio entre os aminoácidos limitantes e os outros aminoácidos, com o objetivo de satisfazer as exigências do animal resultando em produção animal com menor custo e máxima eficiência (Vieira e Angel 2012).

A metionina é um aminoácido sulfurado essencial e o primeiro limitante em dietas de aves, necessária para manter o crescimento e outras funções metabólicas, permitindo o máximo potencial genético, assim o seu fornecimento se torna indispensável na dieta uma vez que esse aminoácido não é sintetizado no organismo em quantidades suficientes às suas exigências de manutenção, crescimento e produção para manter as funções fisiológicas (Yang *et al.* 2004).

Algumas das principais funções da metionina estão relacionadas à síntese de proteína corporal (Tesseraud *et al.* 2008), regulação celular e promoção do crescimento (Del Vesco *et al.* 2013), apresenta função antioxidante (Zhang *et al.* 2015), imunológica

e anti-inflamatório (Selhub e Troen 2016), além de ser a principal doadora de grupos metil para o processo de metilação do DNA, sendo esse um dos mecanismos responsável por modular a expressão gênica (Szyf 2011).

Existem várias fontes de metionina utilizadas para a nutrição de frangos de corte porém, as suplementações nas dietas na forma de aminoácidos industriais são geralmente a DL-metionina e a metionina hidroxí-análoga (MHA), os quais são absorvidos e convertidos em L-metionina pelo metabolismo do animal para a realização das funções metabólicas como metilação e a síntese de metabólitos de enxofre como a cisteína e taurina (Agostini *et al.* 2016). Outra possibilidade é a utilização de dipeptídeo de metionina, DL-metionil-DL-metionina, sendo considerada como uma fonte de aminoácido mais eficientemente absorvido, por apresentar transportador específico o que permite maior velocidade de transporte do dipeptídeo além de apresentar maior eficiência energética uma vez que o dipeptídeo ao ser absorvido será metabolicamente convertido em duas moléculas de L-metionina (Gilbert *et al.* 2008).

1.1. Fisiologia cardíaca das aves em ambiente de estresse térmico

O sistema cardiovascular composto pelo coração e pelos vasos sanguíneos, é responsável por suprir os tecidos com oxigênio e nutrientes, enquanto remove o dióxido de carbono e outros resíduos metabólicos. Nas aves e nos mamíferos, o coração é composto por dois átrios e dois ventrículos, um dos vasos sanguíneos presente é a aorta, sendo essa a maior artéria, que possui enorme elasticidade para suportar a pressão gerada pelo sangue bombeado pelo ventrículo. O sistema cardiovascular é bastante eficiente, pois o sangue desoxigenado e oxigenado não é misturado, garantindo assim que os tecidos do corpo sejam supridos com sangue saturado de oxigênio (Frandsen, Wilke, Fails 2005).

Em aves adultas, a temperatura corporal oscila entre 40 e 41°C, sendo essa temperatura mantida por meio de reações homeostáticas. Para tal, existe o princípio de equilíbrio térmico, que ocorre pela intensa produção de calor gerado por processos metabólicos dos principais órgãos (cérebro, coração e vísceras que juntos geram cerca de 60% da produção de calor corporal) e a dissipação desse calor para o ambiente (Sellier *et al.* 2014).

As aves possuem como particularidade, a ausência de glândulas sudoríparas, o

que dificulta as trocas de calor com o ambiente. Por isso o primeiro mecanismo de dissipação de calor é pela forma sensível (radiação, condução e convecção) por meio de mudanças comportamentais com a diminuição no consumo, aumento de ingestão de água, ficam mais quietas e ofegantes, com as asas levantadas, expõem a região ventral, bico aberto, eriçam as penas, e, caso necessário, ocorre também a ativação do mecanismo latente com a elevação da frequência cardiorrespiratória, gerando aumento no débito cardíaco, do fluxo sanguíneo, vasodilatação cutânea e desequilíbrio eletrolítico (McCafferty *et al.* 2017).

Os fatores ambientais, dentre esses os fatores térmicos, representado principalmente pela elevada temperatura é considerado o estressor ambiental de maior relevância na avicultura mundial, pois compromete a manutenção da homeotermia, uma vez que o frango de corte é um animal geneticamente aprimorado para proporcionar excelentes índices zootécnicos (Havenstein *et al.* 2003), sem melhorias semelhantes no sistema cardiovascular (Kumari *et al.* 2016) dificultando a dissipação de calor pela forma latente que em situação de estresse térmico, pode levar o animal a hipertermia aguda promovendo portanto, múltiplas alterações fisiopatológicas, alterações metabólicas e enzimáticas (Giloh *et al.* 2012) além de afetar mecanismos bioquímicos e fisiológicos como processos digestivos, frequência cardíaca e respiratória (Zaboli *et al.* 2017) que podem comprometer desempenho animal e levar até mesmo a morte.

O estresse térmico ocorre quando a quantidade de calor produzida por um animal ultrapassa a capacidade de dissipar o calor para o ambiente, e além de muito desconforto gera desempenho produtivo baixo e alto índice de mortalidade (Nardone *et al.* 2010) uma vez que, quando as aves estão sofrendo por estresse térmico, ocorre a aumento da produção de calor metabólico e o aumento na dissipação de calor (Macari *et al.* 2004) provocando mudanças fisiológicas adaptativas, entre as mudanças pode-se citar a vasodilatação cutânea e a diminuição nos tamanho do órgãos dentre eles o coração (Guyton e Hall 2006).

A vasodilatação cutânea ocorre em vasos sanguíneos superficiais, no qual ocorre a redistribuição do fluxo sanguíneo durante a hipertermia, de modo que o sangue seja redirecionado da região mais interna do corpo para a região periférica, em que o calor será dissipado (Chen *et al.* 2010). Ademais, em razão da dificuldade em dissipar o calor, o animal modifica a produção de calor metabólico reduzindo o tamanho dos órgãos que mais produzem calor (Al-Tamimi 2007).

1.2. Estresse oxidativo e sistema enzimático

O estresse por calor é um dos estressores ambientais mais relevantes na avicultura mundial, este afeta o desempenho animal como um todo, além de apresentar múltiplas alterações fisiopatológicas como a ativação do sistema imune, disfunção da barreira intestinal e estresse oxidativo celular resultando desta forma na diminuição da produtividade animal (Quinteiro-Filho *et al.* 2010).

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de compostos antioxidantes e oxidantes. Para combater o estresse oxidativo, o organismo animal dispõe de sistemas antioxidantes do tipo enzimáticos compostos, dentre outras enzimas, pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e, glutathione peroxidase (GPx), que são capazes de metabolizar as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas normalmente nos processos biológicos celulares (Zeng *et al.* 2014) (Figura 1).

SOD: atua como sistema de defesa intracelular que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Weydertn e Cullen 2010).

CAT: metaboliza o peróxido de hidrogênio produzido convertendo-o em água e oxigênio (Weydertn e Cullen 2010).

GSH: é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos cisteína, ácido glutâmico e glicina, que pode encontrar-se sob a forma oxidada (GSSG), forma conjugada (GS-R) e ainda sob a forma reduzida (GSH), sendo essa a forma mais prevalente nas células, sob condições fisiológicas normais, representando cerca de 90%. A GSH age como um potente antioxidante através do tamponamento redox, da desintoxicação de hidroperóxidos inorgânicos e da desintoxicação de xenobióticos atuando em conjunto com as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-Transferase (GST) (Ayer *et al.* 2010).

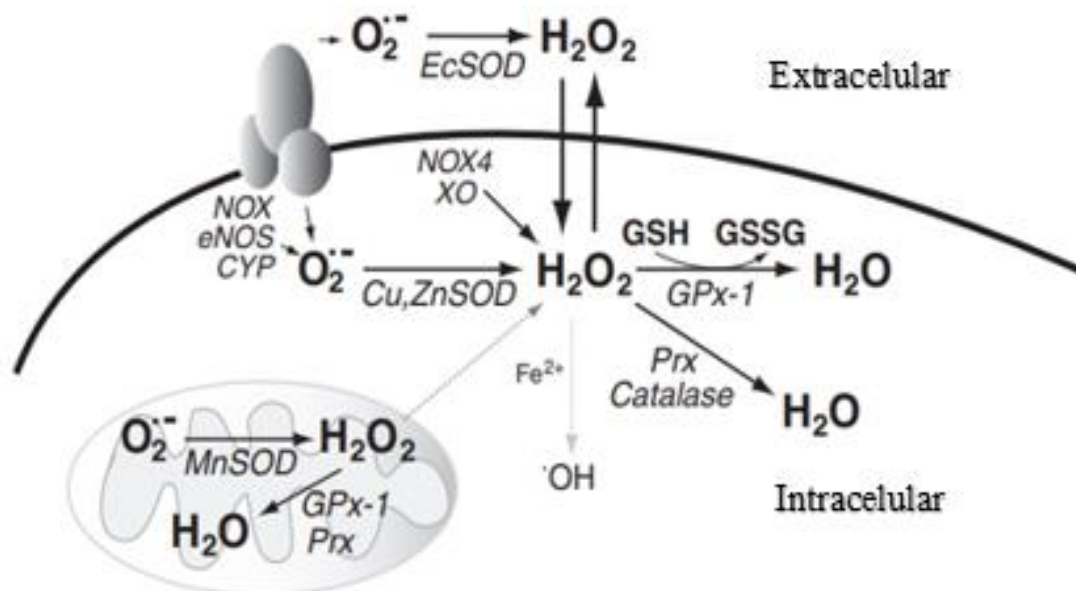


Figura 1. Sistemas antioxidantes do tipo enzimático (Fonte: Adaptado de Lubos, Loscalzo e Handy 2011).

Existe um outro tipo de sistema antioxidante, o não enzimático sendo esse suplementado por meio da dieta no qual podem ser citados as vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E e beta-caroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e vitaminas do complexo B), os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio e etc.), os bioflavonoides (derivados de plantas) e a metionina, componentes nutricionais esses que evitam a ação deletéria das ROS sobre as células (Barbosa *et al.* 2010).

As ROS são moléculas altamente oxidantes e reativas que podem danificar estruturas celulares compostas por carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios o que faz com que suas funções sejam alteradas, resultando assim no desencadeamento de diversas alterações fisiológicas, como o processo inflamatório que ocorre através da ativação de enzimas pró-inflamatórias como a mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG) (Akbarian *et al.* 2016).

A MPO é uma enzima altamente catiônica, presente principalmente nos leucócitos, é responsável pela destruição de patógenos e apresenta papel fundamental na sinalização do parâmetro inflamatório (Nauseef 2014). Para que ocorra a resposta inflamatória é necessário algum fator estimulante, seja esse patógeno ou desestruturação da membrana (Aratani 2018), e a partir de então ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatório, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), as citocinas, adipocinas e as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-7) sendo essas responsáveis pela ativação dos

leucócitos que se fundem ao fagossomo liberando a MPO (El-benna *et al.* 2016) que por sua vez promove a conversão do peróxido de hidrogênio a ácido hipocloroso e de halogenetos em ácidos hipohalosos, levando dessa forma a formação de compostos intermediários altamente reativo (Giovannini *et al.* 2010). A MPO medeia vários processos inflamatórios e por isso pode ser considerada como marcadora para a atividade e acumulação de leucócitos (Aratani 2018).

Outra enzima relacionada aos parâmetros inflamatórios é a N-acetilglucosaminidase (NAG), enzima presente nos lisossomos e produzida principalmente por macrófagos, durante o processo de fagocitose, lise celular ou dano tecidual, sendo a detecção da atividade da NAG utilizada como marcador indireto da resposta inflamatória através do acúmulo e ativação dos macrófagos (Xavier *et al.* 2010; Lamaita *et al.* 2012).

O estresse agudo por calor, pode causar alterações metabólicas gerada pelo estresse oxidativo, decorrente da existência do desequilíbrio entre o sistema antioxidante celular com a superprodução de ROS, que incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radical alquila (L^{\bullet}), alcoxila (LO^{\bullet}) e peroxila (LOO^{\bullet}), tal processo ocasiona o desequilíbrio homeostático, ocasiona a oxidação de moléculas importantes como proteína, DNA, lipídios, dentre outras e inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica celular (Rani *et al.* 2016).

A peroxidação lipídica produz ampla variedade de produtos de oxidação sendo o principal, os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), que desencadeiam processos degenerativos afetando a conformação lipídica, sendo esses componentes essenciais das membranas celulares que mantêm a estrutura e controla a função celular, e contribui para o desenvolvimento de diversas doenças e distúrbios metabólicos de origem cardiovascular (Yin *et al.* 2011).

Neste contexto, diversos mecanismos atuam a fim de amenizar a ocorrência de distúrbios metabólicos os quais incluem, além dos sistemas antioxidantes, a bioatividade do óxido nítrico (NO) (Li e Förstermann 2013).

O NO apresenta inúmeras funções entre elas podemos citar: a vasodilatação (Simmonds, Detterich e Connes 2014), ação termorreguladora (Alberghina *et al.* 2015), modulador de reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, anticoagulante, profibrinolítica, inibidora de agregação e adesão de plaquetas e leucócitos (Singh *et al.*

2011). Dependendo do tipo celular e do estímulo o NO pode atuar em diversos sistemas, tais como o sistema nervoso central (Calabrese *et al.* 2007), sistema gastrointestinal (Kochoar *et al.* 2011), respiratório (Antosova *et al.* 2017), urinário (Gamé *et al.* 2013) e cardiovascular, por ser responsável pela regulação da pressão sanguínea arterial através da contratilidade do miocárdio (Dobutović *et al.* 2011).

A produção enzimática do NO acontece pela oxidação do aminoácido L-arginina, que é convertida em L-citrulina sendo essa conversão mediada por uma família de três enzimas denominadas como óxido nítrico sintases (NOS), nos quais pode-se ressaltar a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que é essencial para a manutenção do tono vascular basal; a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) importante na regulação da transmissão sináptica no sistema nervoso central; e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) sendo essa enzima induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa cardiovascular, encontrando-se expressa em vários processos celulares anormais como por exemplo na insuficiência cardíaca (Dobutović *et al.* 2011).

1.3. Expressão Gênica

1.3.1. Genes do sistema de defesa celular em resposta ao estresse

Os animais de produção estão sujeitos a serem submetidos aos vários tipos de estresse, ao longo de sua vida produtiva, como por exemplo o estresse térmico, elevada concentração de gases, falta de água e alimento, alta densidade, estresse durante o transporte e por barulho. Essa exposição aos potenciais agentes estressores induz diversas mudanças comportamentais, fisiológicas e metabólicas (Fazio e Ferlazzo, 2003; Hambrecht *et al.* 2005) fazendo com que ocorra a alteração na homeostases celular, provocando entre outras alterações o estresse oxidativo. Tal fato, implica na síntese das enzimas antioxidantes e das proteínas de choque térmico (HSPs) que são rapidamente sintetizadas. Essas proteínas estão associadas aos processos de manutenção celular em diversas condições de estresse o que confere a função anti-apoptótica e citoproteção (Al-Aqil e Zulkifli 2009).

Entre as famílias das HSPs, a HSP70 é a mais extensivamente pesquisada pela sua resposta aos diversos estressores (Dastoor e Dreuer 2000; Gabriel *et al.*, 2002; Aghdassi *et al.* 2007). A HSP 70 é expressa em células sob condições normais, entretanto sua expressão é aumentada quando as células são expostas à ação de

diferentes agentes estressantes, incluindo o calor, que promovem a sua ativação que até então estava quiescente. A exposição dos animais as temperaturas elevadas danificam por desnaturação a conformação proteica, e compromete a função das proteínas resultando no acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas em meio intracelular. À medida que ocorre esse acúmulo de proteínas danificadas há o início do mecanismo universal de resposta celular ao estresse, que consiste na rápida expressão da HSP70 que como mecanismo de defesa, repara as proteínas defeituosas (Welch 1992) (Figura 2).

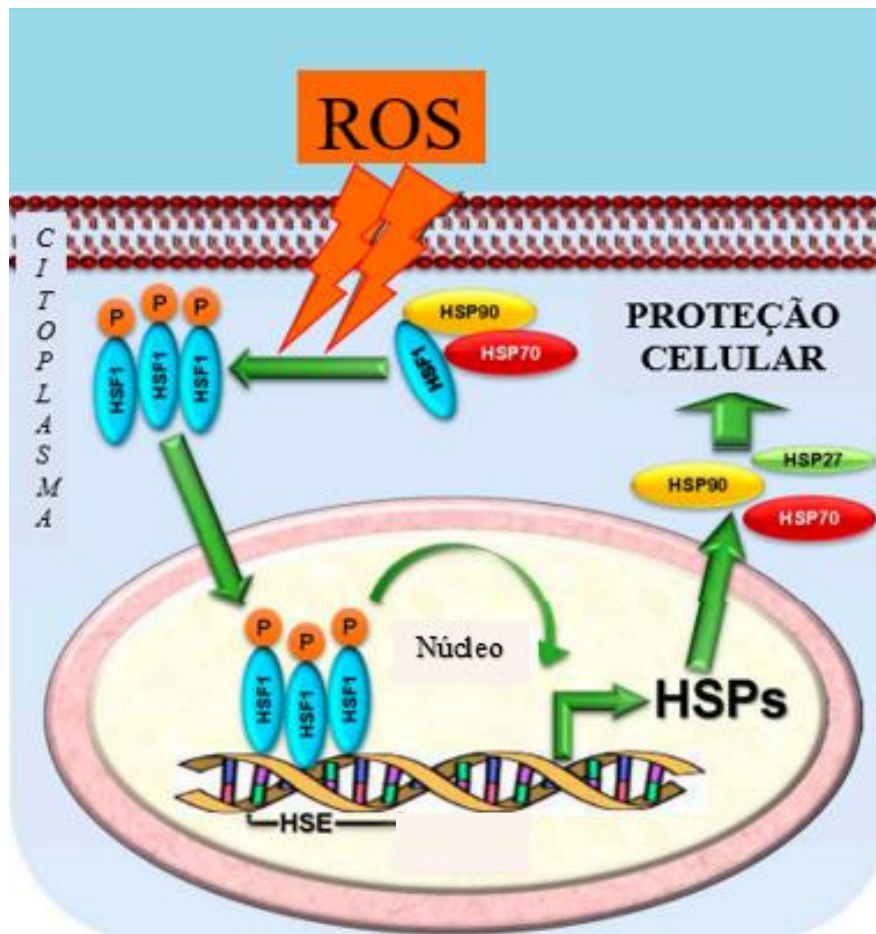


Figura 2. Mecanismo de proteção celular das HSPs (Fonte: Adaptado de Chatterjee e Burns 2017).

Além da HSP70 como forma de defesa, os organismos vivos dispõem de sistemas antioxidantes do tipo enzimático composto por várias enzimas, dentre estas a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx), que são poderosas enzimas antioxidantes intracelulares que metabolizam o superóxido e o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular respectivamente, ambas as enzimas são capazes de metabolizar as ROS produzidas normalmente nos processos biológicos celulares (Zeng *et al.* 2014).

1.3.2. Genes da Apoptose

A apoptose é caracterizada por processos morfológicos dependentes de mecanismos bioquímicos, regulada de forma complexa e ordenada que apresenta sofisticado controle genético, nos quais envolve de maneira ativa as estruturas celulares que funcionam como um sistema de defesa, sendo esse processo de fundamental importância na manutenção da homeostase tecidual. Para tal, o mecanismo de apoptose pode ser desencadeado por duas vias principais de sinalização: a via extrínseca ou do receptor da morte, desencadeada pela ligação específica dos receptores de membrana da superfamília do gene fator de necrose tumoral TNF, e a via intrínseca ou mitocondrial, que envolve a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo C para o citosol. Essas diferentes vias culminam na ativação de proteases conhecidas como caspases (Lanneau *et al.* 2008).

As caspases assumem um papel importante e central no mecanismo da apoptose, seu termo deriva de espécies específicas de proteases aspartato dependentes da cisteína. No processo de apoptose, sete caspases estão envolvidas e distribuídas em dois grupos de caspases: as iniciadoras (caspases -2, -8, -9 e -10) que agem para iniciar e regular a apoptose, atuam clivando as pró-formas inativas das caspases efetoras e as efetoras (caspases -3, -6 e -7), que quando são ativadas culminam no processo de clivagem de substratos específicos de ácido aspártico e morte celular por apoptose (Kim e Kang 2010). Tanto a apoptose mediada pela via receptor de morte, quanto por via mitocondrial causa a ativação da caspase-3 que então age como um efetor de apoptose por clivagem de vários substratos de proteínas (Mani 2008).

A via mitocondrial é regulada por proteínas inibidoras de apoptose dentre elas, a célula-B de linfoma 2 (BCL2), célula-B de linfoma extragrande (BCLX_L), células mieloides de leucemia 1 (MCL-1) e por proteínas indutoras da apoptose como a proteína X associada ao BCL2 (BAX) e Proteína antagonista ao BCL2 (BAK), ambas estão presentes na membrana externa mitocondrial (Kwak 2013). A proteína BCL2 possui a capacidade de se acoplar à proteína BAX impedindo que ocorra a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, a liberação do citocromo C e conseqüentemente a ativação das vias dependentes de caspases inibindo, portanto, o processo de apoptose (Chipuk *et al.* 2010).

1.3.3. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A alta temperatura e umidade relativa do ar podem ser prejudiciais tanto à saúde quanto ao desempenho, principalmente dos frangos de corte que podem ser submetidos ao estresse térmico nas regiões tropicais ou durante os meses de verão nos países de clima temperado. Como já descrito anteriormente a termorregulação é considerada o conjunto dos sistemas responsáveis pela regulação da temperatura corporal, e tem como função o equilíbrio entre a produção (termogênese) e a dissipação (termólise) do calor, para manter a temperatura corporal interna entre 40 e 41°C, em aves adultas (Sellier *et al.* 2014).

Quando a temperatura ambiente se eleva acima da zona de termoneutralidade das aves, ocorre condição de estresse metabólico, podendo gerar dentre outros fatores, a hipertermia aguda, alcalose respiratória e ao desequilíbrio eletrolítico (McCafferty *et al.* 2017).

Os eletrólitos têm um papel importante na manutenção da homeostase no organismo, são responsáveis pela regulação e manutenção de sistemas importantes como o sistema cardíaco, respiratório, nervoso e renal nos quais estão relacionados com a oxigenação de tecidos, pressão arterial, equilíbrio ácido-básico, entre outros. O desequilíbrio destes eletrólitos afeta diretamente o funcionamento destes sistemas, podendo levar a hipertensão arterial. O controle mais específico da pressão arterial é desempenhado dentre outros fatores, pelo sistema renina-angiotensina (SRA), sendo esse considerado um dos mais importantes sistemas reguladores para a homeostase cardiovascular, contribuindo na remodelação cardíaca e vascular em condições patológicas (Li e Förstermann 2013) que adicionalmente se relaciona à homeostase hidroeletrólítica por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Sparks *et al.* 2014).

A ECA é uma metaloprotease catalítica que pode ser encontrada nas células endoteliais pulmonares, epiteliais, neurais, cerebrais, cardiovasculares, adrenais e nas células dos vasos sanguíneos (Lindpaintner e Ganten 1991). Ela é de extrema importância no SRA por converter angiotensina I circulante em angiotensina II (Donoghue *et al.* 2000). A angiotensina II apresenta diversas funções importantes para o funcionamento cardíaco adequado, que se relaciona com o efeito trófico, o aumento do

inotropismo e cronotropismo, o efeito pró-arritmogênico, abertura de canais iônicos e está também envolvida no crescimento de células no remodelamento cardiovascular (Kim e Iwao 2000). Apesar dos efeitos benéficos, o excesso de angiotensina II endógena é extremamente prejudicial, por desempenhar papel fundamental na insuficiência cardíaca congestiva, doença cardíaca isquêmica, causar aumento direto e indireto da pressão arterial o qual é dose dependente e é capaz de regular a produção da citocina e do fator de necrose tumoral (TNF), associados aos efeitos deletérios na função cardíaca (Gavras e Gavras 2002; Libera *et al.* 2001). Além disso, a angiotensina II também atua como agente pró-inflamatório, pró-fibrótico e induz ao estresse oxidativo (Haugen, Croatt e Nath, 2000; Ruster e Wolf 2011).

1.3.4. Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP)

Os processos inflamatórios gerados pelo aumento das ROS podem associar-se ao aparecimento de distúrbios cardiovasculares (Maulik e Das, 2002), algumas proteínas apresentam elevado poder pró-inflamatório, e pode destacar a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), que realiza a transferência recíproca de colesterol esterificado e triglicerídeos entre as lipoproteínas. Assim, a CETP transfere o colesterol esterificado da lipoproteína de alta densidade (HDL) e em troca recebe triglicerídeos provenientes das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), intermédia densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL) (Nicholls *et al.* 2011).

A elevada expressão da CETP perturba a homeostase lipídica, uma vez que resulta na formação de gotículas lipídicas menores, mais metabolicamente ativas promovendo a formação de LDL sendo que o aumento da LDL no sangue é associado à doença cardiovascular aterosclerótica com a ocorrência de infarto do miocárdio (Seidman, Mitchell e Stone 2014).

LITERATURA CITADA

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório anual 2018*. Disponível em: < <http://www.abpa-br.com.br/> >. Acesso em: 29 de setembro de 2018.

Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaukhandi D, Sharif R, Dawra R, Saluja A (2007) Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic

adenocarcinoma. *Cancer research*, 67(2), 616-625.

Agostini PS, Dalibard P, Mercier Y, Van der Aar P, Van der Klis JD (2016) Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers. *Poultry Science* **95**, 560-569.

Akbarian A, Michiels J, Degroote J, Majdeddin M, Golian A, Smet S (2016) Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of animal science and biotechnology*, 7(1), 37.

Al-Aqil A, Zulkifli I (2009) Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. *Poultry science*, **88(7)**, 1358-1364.

Alberghina D, Piccione G, Amorini AM, Lazzarino G, Congiu F, Lazzarino G, Tavazzi B (2015) Body temperature and plasma nitric oxide metabolites in response to standardized exercise test in the athletic horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, **35(9)**, 709-713

Al-Tamimi HJ (2007) Thermoregulatory response of goat kids subjected to heat stress. *Small Ruminant Research* **71**, 280-285.

Antosova M, Mokra D, Pepucha L, Plevkova J, Buday T, Sterusky M, Bencova A (2017) Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiological research*, **66**.

Aratani Y (2018) Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **640**, 47–52.

Asgary S, Rastqar A, Keshvari M (2018) Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 1-27.

- Ayer A, Tan SX, Grant CM, Meyer AJ, Dawes IW, Perrone GG (2010) The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free Radical Biology and Medicine*, **49(12)**, 1956-1968.
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J (2010) Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição* **23**, 629-643.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AMG (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, **8(10)**, 766.
- Chatterjee S, Burns TF (2017) Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *International journal of molecular sciences*, **18(9)**, 1978.
- Cheng X, Su H (2010) Effects of climatic temperature stress on cardiovascular diseases. *European Journal of Internal Medicine*, **21(3)**, 164-167.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell* **37**, 299-310.
- Dastoor Z, Dreyer J (2000) Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *J Cell Sci*, **113(16)**, 2845-2854.
- Del Vesco AP, Gasparino E, Oliveira Neto AR, Rossi RM, Soares MAM, Silva DSCC (2013) Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. *Livestock Science* **151**, 284-291.
- Dobutović B, Smiljanić K, Soskić S, Düngen HD, Isenović ER (2011) Nitric oxide and its role in cardiovascular diseases. *Open Nitric Oxide J*, **3(3)**, 65-71.

- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Breitbart RE (2000) A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*, **87(5)**, e1-e9.
- El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidaló MA, Dang PMC (2016) Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological reviews*, **273(1)**, 180-193.
- Fazio E, Ferlazzo A (2003) Evaluation of stress during transport. *Veterinary Research Communications*, **27(1)**, 519-524.
- Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD (2005) Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda. *Guanabara Koogan*, **7**.
- Furlan RL, Macari M (2002) Termorregulação. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*, **2**, 209-228.
- Gabrie JE, Boleli IC, Macari M, Coutinho LL (2002) Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. *Growth, development, and aging: GDA*, **66(1)**, 27-33.
- Gamé X, Rischmann P, Arnal JF, Malavaud B (2013) Nitric oxide pathway and female lower urinary tract. Physiological and pathophysiological role. *Progres en urologie: journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*, **23(11)**, 926-935.
- Gavras I, Gavras H (2002) Angiotensin II as a cardiovascular risk factor. *Journal of human hypertension*, **16(S2)**, S2.
- Gilbert ER, Wong EA, Webb KE Jr. (2008) Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *Journal Animal Science* **86**, 2135-2155.

- Giloh M, Shinder D, Yahav S (2012) Skin surface temperature of broiler chickens is correlated to body core temperature and is indicative of their thermoregulatory status. *Poultry Science*, **91(1)**, 175-188.
- Giovannini S, Onder G, Leeuwenburgh C, Carter C, Marzetti E, Russo A, Landi F (2010) Myeloperoxidase levels and mortality in frail community-living elderly individuals. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, **65(4)**, 369-376.
- Guyton AC, Hall JE (2006) Tratado de fisiologia médica 11ed (Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan).
- Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CH M, Verstegen MWA, Den Hartog LA (2005) Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *Journal of Animal Science*, **83(4)**, 900-907.
- Hassanzadeh M, Buyse J, Decuypere E (2008) Further evidence for the involvement of anatomical parameters of the cardiopulmonary system in the development of ascites syndrome in broiler chickens. *Acta Veterinaria Hungarica*, **56(1)**, 71-80.
- Haugen EN, Croatt AJ, Nath KA (2000) Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney international*, **58(1)**, 144-152.
- Kim S, Iwao H (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews*, **52(1)**, 11-34.
- Kochar NI, Chandewal AV, Bakal RL, Kochar PN (2011) Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *Int. J. Pharmacol*, **7**, 31-39.
- Kumari A, Tripathi UK, Boro P, Sulabh S, Kumar M, Nimmanapalli R (2016) Metabolic disease of broiler birds and its management: A review. *International*

Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry **3**, 15-16.

Kwak H-B (2013) Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of Exercise Rehabilitation* **9**, 212-219.

Lamaita RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, Silva-Filho AL (2012) Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, **38(5)**, 810-816.

Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**, 743-61.

Li H, Förstermann U (2013) Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, **13(2)**, 161–167.

Libera DL, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Vescovo G (2001) Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF- α and sphingosine. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **33(10)**, 1871-1878.

Lindpaintner K, Ganten D (1991) The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circulation Research*, **68(4)**, 905-921.

Lubos E, Loscalzo J, Handy DE (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, **15(7)**, 1957-1997.

Mani K (2008) Programmed cell death in cardiac myocytes: strategies to maximize post-ischemic salvage. *Heart Failure Reviews* **13**, 193-209.

Maulik N, Das DK (2002) Redox signaling in vascular angiogenesis1, 2. *Free Radical*

Biology and Medicine, **33(8)**, 1047-1060.

McCafferty DJ, Pandraud G, Gilles J, Fabra-Puchol M, Henry PY (2017) Animal thermoregulation: a review of insulation, physiology and behaviour relevant to temperature control in buildings. *Bioinspiration & biomimetics*, **13(1)**, 011001.

Nauseef WM. (2014). Microreview Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol.* **16** (June), 1146-1155.

Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJ, Krueger KA, Wang MD, Shao M, Nissen S E (2011) Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *Jama*, **306(19)**, 2099-2109.

Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Sakai M, Sá LRM, Palermo-Neto J (2010) Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science*, **89(9)**, 1905-1914.

Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC (2016) Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences*, **148**, 183-193.

Rostagno H S, Albino L F T, Donzele J L, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes D C, Ferreira AS, Barreto S L T (2011) Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. 3th. ed. (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.)

Rüster C, Wolf G (2011) Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, **22(7)**, 1189-1199.

Sahraei M (2014) Effects of feed restriction on metabolic disorders in broiler chickens: a review. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **30 (1)**, 1-13.

- Seidman MA, Mitchell RN, Stone JR (2014) Pathophysiology of Atherosclerosis. In *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease* (pp. 221-237).
- Selhub J, Troen AM (2016) Sulfur Amino Acids and Atherosclerosis: A Role for Excess Dietary Methionine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1363**,18-25.
- Sellier N, Guettier E, Staub C (2014) A review of methods to measure animal body temperature in precision farming. *American Journal of Agricultural Science and Technology*, **2(2)**, 74-99.
- Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P (2014) Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*, **51(2-3)**, 121-134.
- Singh AK, Pandita S, Huozha R, Kushwaha R, Chandra VSG, Vaidya MM (2011) ROLE OF NITRIC OXIDE IN IMMUNITY—A REVIEW. *Wayamba Journal of Animal Science*.
- Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM (2011) Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, **4(3)**, 1201-1228.
- Szyf M (2000) The implications of DN methylation for toxicology: Characteriation of homocysteine metabolism in the rat liver. *Biochemical Journal, London*, **350**, 685-692.
- Tesseraud S, Coustard SM, Collin A, Seiliez I (2008) Role of sulfur amino acids in controlling nutrients metabolism and cell functions: implications of nutrition. *British Journal of Nutrition*, 1-8,
- Tickle PG, Paxton H, Rankin JW, Hutchinson JR, Codd JR (2014) Anatomical and biomechanical traits of broiler chickens across ontogeny. Part I. Anatomy of the musculoskeletal respiratory apparatus and changes in organ size. *PeerJ*, **2**, e432.

- Vieira SL, Angel CR (2012) Optimizing broiler performance using different amino acid density diets: what are the limits?. *Journal of Applied Poultry Research*, **21(1)**, 149-155.
- Yang LJ, Huo ZC, Hou JC, Cheng P, Sun SL (2004) The Comparison of the Effect of the Solid Methionine and Liquid Methionine on the Chicken Biological Titer. *Chinese Journal of Animal Science*, **40**, 16-18.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, **111(10)**, 5944-5972.
- Welch WJ (1992) Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiological reviews* **72**, 1063-1081.
- Weydert CJ, Cullen JJ (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, **5(1)**, 51.
- Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, Rocha MA, Campos PR, Cota BDCV, Belo AV (2010) Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **64(3)**, 220-225.
- Zaboli GR, Rahimi S, Shariatmadari F, Torshizi MAK, Baghbanzadeh A, Mehri M (2016) Thermal manipulation during Pre and Post-Hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry science*, **96(2)**, 478-485.
- Zeng ZK, Li QY, Piao XS, Liu JD, Zhao PF, Xu X, Zhang S, Niu S (2014) Forsythia suspensa extract attenuates corticosterone-induced growth inhibition, oxidative injury, and immune depression in broilers. *Poultry science* **93**, 1774-1781.
- Zhang S, Wong EA, Gilbert ER (2015) Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. *Frontiers Bioscience* **7**, 478-490.

II. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação do dipeptídeo de metionina e do estresse térmico agudo em frangos de corte sobre os aspectos morfométricos do coração, parâmetros inflamatórios, a temperatura corporal e a expressão dos genes do sistema antioxidante, da apoptose, do sistema renina-angiotensina e do transporte de lipídeos.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo I:

Pesquisar uma nova fonte de metionina e seus efeitos no desempenho e no coração de frangos de corte submetidos ao estresse térmico agudo por 24 horas.

Averiguar os aspectos morfométricos do coração em condições de estresse térmico agudo por 24 horas.

Mensurar a expressão do gene proteína de choque térmico 70 kDa (*HSP 70*), dos genes relacionados à apoptose, caspase 3 (*CASP3*), célula-B de linfoma 2 (*BCL2*), proteína X associada ao Bcl-2 (*BAX*), e genes do sistema antioxidante, superóxido dismutase (*SOD*), glutationa peroxidase 3 (*GPX3*).

Artigo II:

Analisar os efeitos do estresse térmico agudo por 12 horas em frangos de corte de 42 dias sobre a temperatura corporal por meio de duas vias de mensuração.

Determinar a influência do estresse térmico agudo sobre os parâmetros inflamatórios, parâmetros de estresse oxidativo e níveis de nitrito.

Estudar os aspectos morfométricos do coração e da artéria aorta de frangos de corte submetidos ao estresse térmico agudo por 12 horas.

Mensurar a expressão dos genes óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*), enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e proteína de transferência de colesterol esterificado (*CETP*) no coração de frangos de corte submetidos ao estresse térmico agudo.

IV Estresse térmico agudo promove alterações morfológicas e moleculares no coração de frangos de corte

(Animal Production Science)

Resumo. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse térmico agudo (32°C; 12 horas) em frangos de corte sobre a temperatura corporal, por meio de dois métodos de mensuração, via retal e por probe. Para atingir esse objetivo, aspectos morfométricos do coração e da artéria aorta, e a expressão dos genes enzima conversora de angiotensina (*ECA*), proteína de transferência de colesterol esterificado (*CETP*), superóxido dismutase (*SOD*), glutatona peroxidase (*GPX3*) e óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*) foram analisados. Também foram avaliados parâmetros inflamatórios (mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase), parâmetros de estresse oxidativo (grupos sulfidrílicos não proteicos, atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, níveis de glutatona S-transferase, hidroperóxidos lipídicos e espécies reativas de oxigênio) e níveis de nitrito. Foram utilizados 36 frangos de corte com 42 dias de idade distribuídos em esquema fatorial 2x2: dois ambientes térmicos (conforto a 18°C e estresse a 32°C) e dois métodos de aferição da temperatura corporal (via probe e via retal). O estresse térmico desencadeou aumento na temperatura corporal independentemente da via de aferição. Houve efeito significativo na espessura da parede da artéria aorta e nos diâmetros látero lateral e ântero posterior ($P < 0,05$). Da mesma forma, houve diferença nas dosagens de hidroperóxidos lipídicos, na quantificação das espécies reativas de oxigênio e na dosagem de nitrito ($P < 0,05$). A quantificação do mRNA dos genes *iNOS*, *ECA* e *CETP* foram significativamente maior nos animais submetidos ao estresse térmico. Assim, pode-se concluir que o estresse térmico agudo foi capaz de promover diversas alterações morfológicas e moleculares no coração e na artéria aorta de frangos de corte.

Palavras-chave: avicultura, células cardíacas, parâmetros bioquímicos.

Introdução

O melhoramento genético proporcionou grande avanço no crescimento e desenvolvimento do frango de corte possibilitando rápido ganho de peso, baixa conversão alimentar, elevado rendimento de carcaça e aumento na deposição de tecido muscular, principalmente na região peitoral (Sahraei 2014). No entanto, o acelerado aumento da massa muscular pode tornar os animais suscetíveis ao desenvolvimento de transtornos metabólicos em decorrência do desajuste entre o ganho de peso acelerado e a inerente falta de adaptação do aparelho cardiorrespiratório (Tickle *et al.* 2014).

A inabilidade do aparelho cardiorrespiratório em se ajustar à demanda da massa corporal mostra-se mais evidente em situações de temperatura ambiente elevada, uma vez que frangos de corte são extremamente sensíveis à variação brusca de temperatura (Gous e Morris 2005). Assim, o aumento da temperatura é considerado um dos estressores ambientais de maior relevância na avicultura de países tropicais impactando negativamente o consumo de alimento, ganho de peso, taxa de morbidade e mortalidade em decorrência das múltiplas alterações fisiopatológicas relacionadas a essa condição (Quinteiro-Filho *et al.* 2010).

Dentre as principais alterações fisiopatológicas, o estresse oxidativo e os distúrbios metabólicos como a síndrome da morte súbita, hipertermia aguda, alcalose respiratória e desequilíbrio eletrolítico se destacam (Brossi *et al.* 2009; Rani *et al.* 2016). O estresse oxidativo pode aumentar a lipoperoxidação provocando diversas alterações funcionais nas células. Os compostos gerados pelo estresse oxidativo (radicais superóxido (O_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)) são altamente reativos e modificam várias macromoléculas biologicamente ativas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Akbarian *et al.* 2016). Por outro lado, distúrbios metabólicos estão associados a perdas econômicas e produtivas pela elevada taxa de mortalidade nestes animais (Brossi *et al.* 2009).

Adicionalmente, parte das disfunções celulares associadas ao estresse térmico pode estar relacionada às alterações na expressão de diferentes genes em diferentes rotas metabólicas. Alterações nas respostas fisiológicas dos órgãos e falhas nos sistemas enzimáticos celulares podem prejudicar a homeostasia corporal (Gasparino *et al.* 2014).

Neste contexto, a compreensão de como o estresse térmico pode interferir não só

na morfometria do coração e da artéria aorta, mas também em processos metabólicos específicos em nível celular e molecular, torna-se cada vez mais importante. Desta forma, este estudo objetivou compreender os possíveis efeitos do estresse térmico agudo (32°C; 12 horas) sobre a temperatura corporal por meio de duas via vias de aferição (via probe e via retal), aspectos morfométricos do coração e da artéria aorta, expressão gênica (*SOD*, *GPX3*, *iNOS*, *ECA* e *CETP*), parâmetros inflamatórios (mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase), parâmetros de estresse oxidativo e níveis de nitrito em frangos de corte com 42 dias de idade.

Material e métodos

Animais

Este estudo foi conduzido de acordo com as especificações do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizados 36 frangos de corte machos (Cobb 500) criados de acordo com o guia da linhagem Cobb até os 42 dias de idade. Tais aves foram distribuídas em esquema fatorial 2x2 sendo dois ambientes (conforto térmico a 18°C e estresse térmico a 32°C por 12 horas) e duas vias de aferição de temperatura (via probe e via retal).

As dietas foram formuladas para atender as exigências nutricionais durante os períodos de 1 a 21 dias e de 22 a 42 dias (Rostagno *et al.* 2011) (Tabela 1). Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período de criação.

Tabela 1. Dietas Experimentais

	1-21 dias	22-42 dias
Ingredientes (%)		
Milho PR 7,8%	54,17	59,8
Farelo de soja 46% PB	37,3	32,4
Óleo Soja	3,8	4,5
Fosfato bicálcico 20%	1,53	1,07
Calcáreocalcítico Ca 38%	1,16	0,93
Sal comum	0,45	0,43
DL - Metionina 99%	0,28	0,27
L-Treonina 98,5%	0,04	0,002
L-Lisina-78%	0,15	0,15
Suplemento mineral e vitamínico	0,4	0,4
Inerte	0,03	0,02
Nutrientes		
PB (%)	22	20
Energia (Kcal)	3053	3169
M+C Dig	0,856	0,810
Lis Dig	1,199	1,080
TripDig	0,244	0,218
Treo Dig	0,779	0,700
IsolDig	0,855	0,772
ValinDig	0,923	0,842
ArgDig	1,384	1,243
Sódio	0,200	0,19
Cálcio	0,876	0,68
Pdisp	0,450	0,35
Análise da composição (%)		
Proteína bruta	22,36	19,53
Lisina digestível	1,091	1,139
Metionina+Cistina	0,585	0,891
Treonina	0,726	0,756
Valina	0,900	0,939
Isoleucina	0,813	0,853
Arginina	1,225	1,272

Conteúdo/kg Inicial: Vit. A – 2.270,000 UI; Vit. E – 8.330 UI; Vit. B1 – 591 mg; Vit B2 – 1.490 ng; Vit. B6 – 858 mg; Vit. B12 3.500 mg; Vit. K3 – 450 mg; Pantotenatocálcio – 2.970 mg; Niacina – 8.820 mg; Ácidofólico – 200 mg; Biotina – 20 mg; Colina – 88 mg; Zinco – 19 mg; Ferro - 14 mg; Manganês – 20 mg; Cobre – 3.040 mg; Iodo – 290 mg; Cobalto – 50 mg; Selênio – 88 mg; Etoxiqum – 25 mg; B.H.A – 20 mg. Crescimento: Vit. A – 2.250,000 UI; Vit. D3 - 500.000 UI; Vit. E – 7.000 UI; Vit. B1 – 450 mg; Vit B2 – 1.000 ng; Vit. B6 – 450 mg; Vit. B12 3.500 mg; Vit. K3 – 420 mg; Pantotenatocálcio - 2.500 mg; Niacina – 7.000 mg; Ácidofólico – 180 mg; Biotina – 15 mg; Colina – 55 g; Zinco – 12 g; Ferro - 12 g; Manganês – 15 g; Cobre – 3.000 mg; Iodo – 250 mg; Cobalto – 50 mg; Selênio – 72 mg; Etoxiqum – 40 mg; B.H.A – 40 mg.

Monitoramento da temperatura corporal

Para o monitoramento da temperatura corporal, as aves dentro de cada grupo experimental (conforto e estresse) foram divididas em dois grupos: via probe e via retal (n=7).

Via Probe

A aferição da temperatura via probe foi realizada continuamente nas 12 horas de experimentação que antecederam o abate, sendo as leituras registradas a cada 10 minutos. Para tanto, um sistema de registro de dados (*data loggers* iButton®, *Embedded Systems*, KY, USA) foi cirurgicamente implantado na cavidade celomática dos animais, sete dias antes do período de coleta de dados (períodos de recuperação do animal). A colocação do *data logger* (1,5 cm de diâmetro x 0,6 cm de altura) foi realizada após anestesia geral com isoflurano, remoção de penas e assepsia local com clorexidina 2%. Posteriormente, camadas musculares e pele foram suturadas e os animais foram tratados com duas doses de enrofloxacin (10 mg/kg, i.m.) e flunixinameglumina (2,5 mg/kg, i.m.), uma ao final da cirurgia e outra após transcorridas 6 horas. Para a coleta de dados, os *data loggers* foram removidos e analisados na ocasião do abate.

Via retal

A mensuração da temperatura corporal por via retal foi realizada nos dois grupos, ambiente de conforto e de estresse, de hora em hora, durante o período experimental (12 horas prévias ao abate) por meio de termômetro digital com bulbo proeminente e arredondado que facilita a introdução e diminui o desconforto dos animais. As aves foram contidas em decúbito lateral e o termômetro foi inserido 2,5 cm acima da cloaca dos animais.

Análises morfométricas e ensaios bioquímicos

Coleta do coração

Após o abate, as aves foram submetidas à toracotomia, à abertura do pericárdio fibroso e à remoção cirúrgica do órgão por meio de uma incisão sobre os grandes vasos da base. O coração foi imediatamente pesado em uma balança analítica (Shimadzu®) e perfundido com solução de Tampão Fosfato Salino (PBS; 0,1 M; pH 7,4) através do

tecido miocárdico para completa remoção do sangue alojado em suas câmaras.

Na sequência, os corações foram cortados imediatamente abaixo do septo atrioventricular e o tecido cardíaco acima deste septo foi utilizado para as análises morfométricas do coração. Assim, os átrios foram prontamente fixados em paraformaldeído a 4% durante 72 horas e posteriormente armazenados em álcool a 70%. O tecido do septo atrioventricular foi subdividido, conservado em nitrogênio líquido e subsequentemente armazenado em freezer -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos que incluíram as avaliações dos parâmetros inflamatórios, a dosagem de nitrito e as análises dos parâmetros de estresse oxidativo.

Análises morfométricas do átrio e da artéria aorta

Os átrios previamente armazenados foram utilizados para a captura de imagens que serviram para mensuração das câmaras cardíacas (diâmetros látero lateral e ântero posterior dos átrios, espessura das paredes atriais direita e esquerda, e espessura do septo interatrial) e da artéria aorta (espessura da parede, diâmetros látero lateral e ântero posterior).

Para a captura das imagens, uma lupa (Motic[®] TIM-2B) acoplada a uma câmara (OPTON[®]) foi utilizada, e todas as imagens foram analisadas por meio do programa *ImageJ*[®] (IMAGE PROPLUS[®] 5.2 da Media Cybernetics, São Paulo, Brasil). A calibração para padronização da captura foi feita utilizando uma tira de calibração de 7500 µm. Para evitar a interferência do peso vivo da ave, as mensurações foram corrigidas de acordo com a média do peso relativo do órgão através da fórmula: [(peso do coração/peso vivo)*100], e resultou no fator de correção de 0,61% para os animais do grupo de conforto térmico e 0,58% para os animais do grupo de estresse térmico.

Ensaio bioquímico

Para obtenção do homogenato utilizado nos ensaios bioquímicos, o tecido cardíaco foi pesado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 6,5. Parte deste homogenato foi utilizada para quantificação dos níveis de glutathione (GSH) e parte foi centrifugada por 20 minutos a 9.000 g. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi utilizado para as análises das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione s-transferase (GST), e para a mensuração dos níveis de

hidroperóxidos lipídicos (LOOH). O precipitado foi utilizado para as análises das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosamidase (NAG).

A quantificação dos níveis de GSH foi determinada adicionando ácido tricloroacético a 12% ao homogenato. A solução foi homogeneizada, centrifugada por 15 minutos a 9.700 g e tampão Tris (0,4 M; pH 8,9) foi acrescentado às microplacas de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5,5'- ditiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB; 1 mM) e a leitura foi realizada em até 5 minutos em espectrofotômetro em 415 nm. Os valores obtidos foram interpolados numa curva padrão de GSH e expressos em μg GSH/g de tecido (Sedlak e Lindsay 1968).

A mensuração da atividade da CAT foi realizada diluindo o sobrenadante em tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 6,5) na proporção de 1:10. Em uma placa de 96 poços, a amostra foi homogeneizada em uma solução contendo tampão tris-HCl-EDTA (0,1M; pH 8,5), água destilada e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As leituras foram feitas a 240 nm. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Aebi 1984).

A dosagem da atividade da SOD considerou sua habilidade em inibir a auto-oxidação do pirogalol. O sobrenadante foi homogeneizado em tampão tris-HCl (200 mM) e EDTA (2 mM; pH 6,5) e pirogalol 1 mM foi adicionado. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos e a reação foi interrompida com HCl 1 N. A solução foi centrifugada por 4 minutos a 14.000 g e o sobrenadante foi pipetado em microplacas para leitura em espectrofotômetro a 405 nm. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% (IC_{50}) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína (Marklund e Marklund 1974).

Para a análise da atividade enzimática da GST, a amostra foi diluída em tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 6,5) e em seguida pipetada em placa de 96 poços. A reação foi iniciada pela adição de uma solução contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 6,5), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm usando o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar/cm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Warholm *et al.* 1985).

O total de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) foi determinado por meio do ensaio de oxidação de ferro II na presença de xilenol laranja. As amostras foram homogeneizadas em metanol 90 % na proporção de 1:10 e centrifugadas por 30 minutos a 10000 g a 4 °C. Em placa de 96 poços foram pipetados o sobrenadante resultante e o meio reacional (metanol 90 %, xilenol laranja, ácido sulfúrico 25 mM, hidroxitolueno

butilado 4 mM e sulfato ferroso de amônio 250 mM) o qual foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm. A concentração de LOOH foi determinada a partir do coeficiente de extinção de 4,3 mmolar/cm e os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido (Jiang *et al.* 1991).

A atividade da MPO foi avaliada ressuspendendo o precipitado em tampão fosfato de potássio 80 mM contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C, por 20 minutos a 11.000 g. Em placa de 96 poços foram adicionados o sobrenadante e uma solução contendo tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,4) e peróxido de hidrogênio a 0,017 %. A reação foi iniciada com tetrametilbenzidina e após 3 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com acetato de sódio (1,46 M; pH 3,0). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm e os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/min/mg de proteína (Bradley *et al.* 1982; De Young *et al.* 1989).

Para a dosagem de atividade da NAG, amostras contendo o sobrenadante foram incubadas com tampão citrato (5 mM; pH 4,5) na presença do p-nitrofenil-N-acetil-fl-D-glucosaminida (2,24 mM). As microplacas foram incubadas por um período de 60 minutos a 37° C e a reação foi interrompida com tampão glicina (200 mM; pH 10,4). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm e os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína/hora (Bailey 1988).

Os cálculos dos ensaios bioquímicos consideraram a concentração de proteínas determinada pelo kit BCA TM *protein assay kit*[®] (PIERCE, BCA *protein*), que adota a albumina bovina como padrão. O teste foi realizado seguindo as instruções do fabricante em placa de 96 poços.

Para a determinação das espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente o ânion radical superóxido, as amostras armazenadas em freezer a -80°C foram pesadas e homogeneizadas em tampão tris-EDTA (5 mM; pH 8,5). Após a incubação das mesmas com diclorofluoresceína diacetato (DFD; 1 mM) por 40 minutos ao abrigo da luz, a fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro. Todas as medidas foram realizadas utilizando comprimento de onda com excitação de 488 nm e emissão de 520 nm e os resultados foram expressos em nmol de DFD/ mg de proteína (Brandt e Keston 1965).

Dosagem dos níveis de nitrito

Os níveis de nitrito foram obtidos por meio da Reação de Greiss. Para tanto, o tecido cardíaco foi homogeneizado em solução de tampão fosfato de sódio (PBS 0,1M; pH 7,4) e centrifugado por 10 minutos a 3000 g. Posteriormente, o sobrenadante foi adicionado ao reagente de Greiss (solução contendo ácido fosfórico, sulfanilamida e N-1-naphitiletlenodiamida) e os níveis de nitrito foram mensurados considerando leitura em espectrofotômetro a 570 nm, em placas de 96 poços. A concentração de nitrito foi calculada usando uma curva padrão construída no intervalo de 100 μM a 1,56 μM de nitrito de sódio e os níveis de nitrito foram expressos como $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ (Tiwari *et al.* 2011).

Expressão Gênica

Para a análise da expressão gênica, amostras do tecido cardíaco de oito animais/grupo foram coletadas, imediatamente conservadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA. O RNA total foi extraído com o uso do reagente TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as normas do fabricante.

A concentração do RNA foi mensurada via espectrofotômetro (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific[™]) no comprimento de onda de 260 nm e a integridade do mesmo foi avaliada em gel de agarose 1% corado com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit SuperScript[™] III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen Corporation, Brazil) e as reações foram realizadas de acordo com as orientações do fabricante. Logo após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. As reações de PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase - RT- qPCR) foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR[™] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[™], USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os primers utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes depositadas no site www.ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 2): superóxido dismutase

(*SOD*), glutathiona peroxidase (*GPX3*), óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*), enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e proteína de transferência de colesterol esterificado (*CETP*).

Tabela 2. Sequências de primers para a reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT- qPCR)

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Número de acesso	Amplicon (pb)
<i>SOD</i>	F-AGATGGCAGTGGGAAATGAG R-ACTCAAGACAGCAGAGTAGTAATG	NM_205064	110
<i>GPX3</i>	F-GGAGAGGGAGAAGGTGAAATG R-TGGCCACGTTGACAAAGA	NM_001163232.2	137
<i>iNOS</i>	F-TCCTGAGTTCTGTGCCTTTG R-GTTCATCTCTTCACCCACTG	U46504.1	92
<i>ECA</i>	F- TCACCCGCATCCTCAATAAG R-GTTGTA CTCTTCAGCTCATCC	NM_001167732.1	128
<i>CETP</i>	F-TTTAAAGGAGATCCCAAGGAGC R- ACTCACATCTTCAGCCATACAG	NM_001034814.2	135
<i>β-actina</i>	F-GCCAACAGAGAGAAGATGAC R-CACCAGAGTCCATCACAATAC	L08165	113

Análise estatística

O método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para as análises de expressão relativa, sendo seus resultados expressos como unidade arbitrária (UA). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2x2, sendo dois ambientes (conforto e estresse) e dois sistemas de aferição (probe e retal). Os dados de todas as variáveis, com exceção da temperatura retal, foram analisados considerando dois tratamentos (conforto e estresse térmico) por meio do procedimento GLM do SAS, e as médias foram comparadas pelo teste de F ($P < 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2004). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Resultados

A análise da temperatura corporal em função das vias de aferição e dos ambientes aos quais os animais foram mantidos mostrou interação entre os fatores. Animais mantidos em ambiente de estresse térmico tiveram suas temperaturas corporais elevadas ($P < 0,0001$) independentemente da via de aferição utilizada (via probe: $42,01^{\circ}\text{C}$; via retal: $41,97^{\circ}\text{C}$) (Fig 1). Nos animais em temperatura de conforto, a aferição

via probe apresentou-se mais sensível à variação da temperatura (via probe: 41,24°C; via retal: 41,38°C) (Fig 2.).

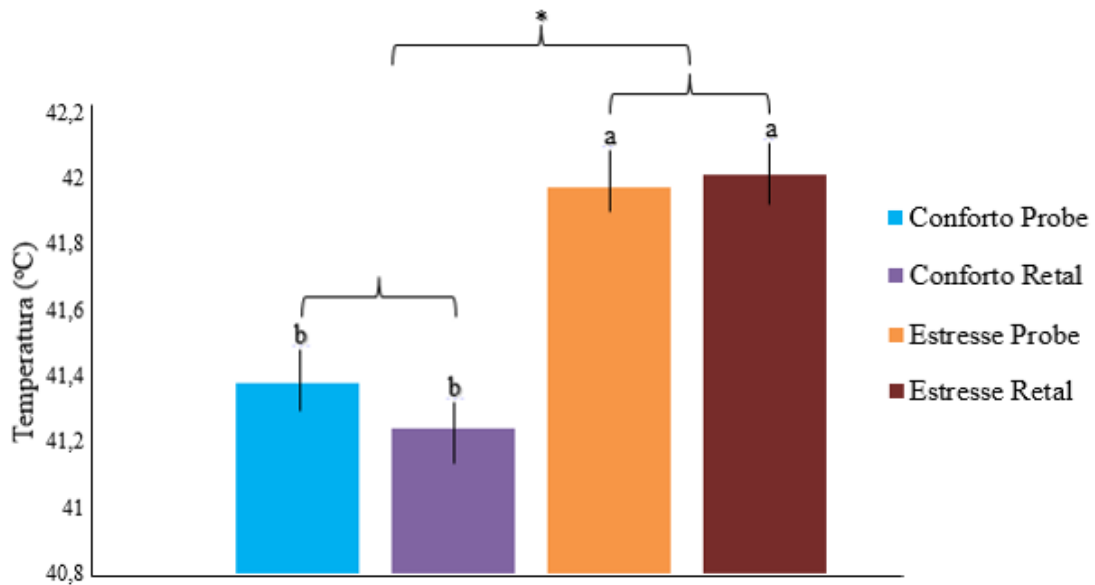


Fig 1. Temperatura corporal aferida via probe e retal em condições de conforto e estresse térmico. a,b,* Valores médios significativamente diferentes ($P < 0,05$).

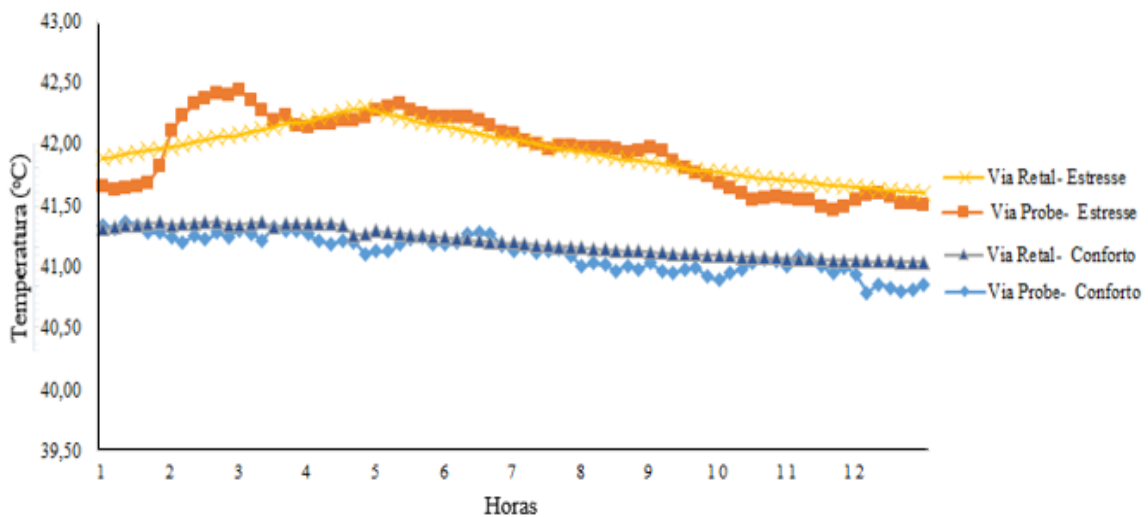


Fig 2. Temperatura corporal dos frangos de corte aos 42 dias submetidos ao ambiente de conforto e de estresse térmico considerando as vias de aferição por probe ou retal por um período de 12 horas ininterruptas.

Não houve efeito significativo do ambiente (conforto e estresse) sobre as medidas relacionadas aos diâmetros látero lateral e ântero posterior do coração (Tabela

3). Resultados semelhantes foram verificados em relação às espessuras das paredes atriais direita e esquerda, e do septo interatrial. Todavia, o estresse térmico modificou as mensurações relativas à artéria aorta tais como a espessura de sua parede (3,399 mm; $P = 0,0023$), seu diâmetro látero lateral (7,887 mm; $P = 0,0106$) e ântero posterior (6,068 mm; $P = 0,0155$). Desta forma, embora a espessura da parede deste vaso tenha aumentado, seus diâmetros diminuíram significativamente (Fig. 3).

Os resultados dos ensaios bioquímicos são apresentados na Fig. 4. Foi verificado o efeito significativo da temperatura ambiental sobre a quantificação dos hidroperóxidos lipídicos ($P=0,0230$), das ROS ($P=0,0283$) e sobre a dosagem do óxido nítrico ($P=0,0363$). A temperatura foi capaz de aumentar a quantidade de hidroperóxidos lipídicos (0,032 mmol/mg de tecido), das ROS (883,61 nmol de DFD/ mg de proteína) e diminuir a dosagem do óxido nítrico (7,734) no tecido cardíaco.

Tabela 3. Morfometria do coração de frangos de cortes aos 42 dias de idade, apresentados como média (desvio-padrão)

	DLL (mm)	DAP (mm)	PAD (mm)	PAE (mm)	SIA (mm)	EA (mm)	DLLA (mm)	DAPA (mm)
Conforto	36,359 (1,676)	30,422 (2,155)	4,92 (0,73)	9,84 (0,624)	8,529 (1,870)	2,870 ^b (0,266)	11,573 ^a (2,859)	7,562 ^a (0,843)
Estresse	37,21 (12,261)	36,123 (2,857)	4,024 (0,95)	8,977 (1,113)	8,86 (2,175)	3,399 ^a (0,247)	7,887 ^b (1,498)	6,068 ^b (1,119)
Probabilidade	0,4383	0,3302	0,0715	0,0988	0,7651	0,0023	0,0106	0,0155

Diâmetro látero lateral (DLL), diâmetro ântero posterior (DAP), parede atrial direita (PAD), parede atrial esquerda (PAE), septo interatrial (SIA), espessura da artéria aorta (EA), diâmetro látero lateral da artéria aorta (DLLA), diâmetro ântero posterior da artéria aorta (DAPA).
^a, ^b Valores médios significativamente diferentes (P <0,05).

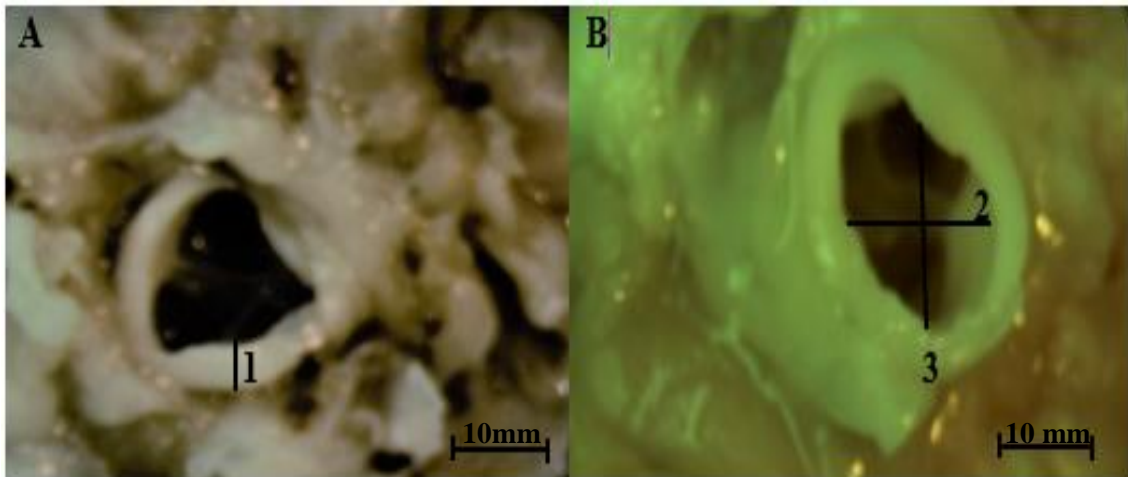


Fig 3. Fotomicrografias de artérias aortas. Imagens utilizadas para as análises morfométricas. **A:** artéria aorta de frango mantido em ambiente de conforto térmico; **B:** artéria aorta de frango mantido em ambiente de estresse térmico. **1:** espessura da parede arterial; **2:** diâmetro látero lateral; **3:** diâmetro ântero posterior.

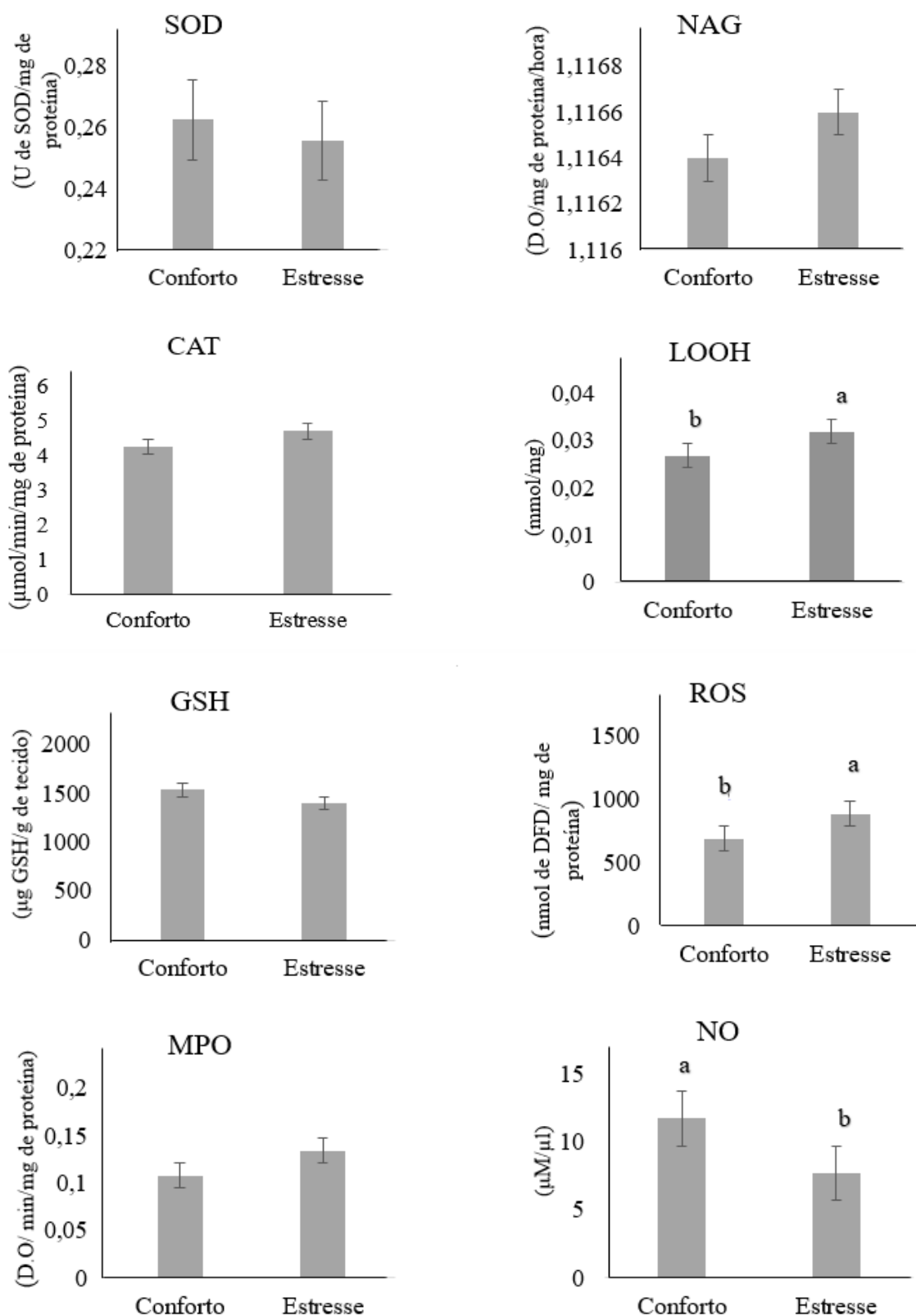


Fig 4. Ensaio bioquímico: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona (GSH), mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG), hidróperóxidos lipídicos (LOOH), espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). ^{a,b}Valores médios significativamente diferentes (P < 0,05).

A expressão dos genes do sistema antioxidante *SOD* e *GPX3*, dos genes *iNOS*, *ECA* e *CETP* no coração de frangos de corte estão apresentados na Fig. 5. A expressão destes foi significativamente alterada pelo estresse térmico ($P=0,0536$, $P=0,0227$ e $P=0,0158$, respectivamente).

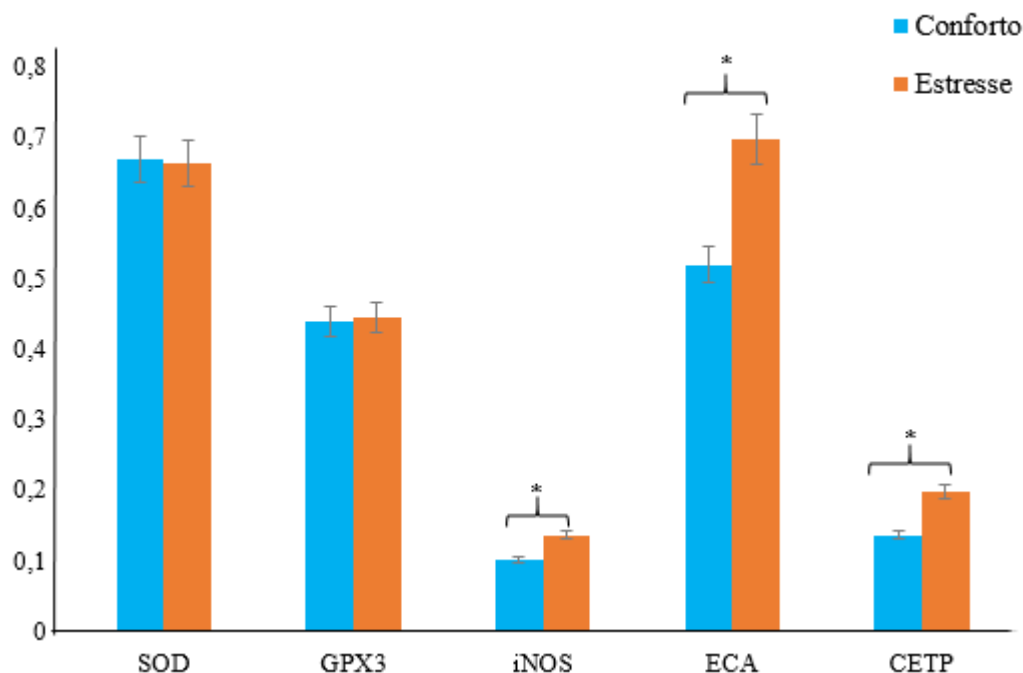


Fig 5. Expressão dos genes Superóxido dismutase (*SOD*), glutathiona peroxidase 3 (*GPX3*), óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*), enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e proteína de transferência de colesterol esterificado (*CETP*) no coração de frangos de corte aos 42 dias de idade submetidos a estresse térmico por 12 horas. *Valores médios significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Discussão

Em aves adultas, a temperatura corporal oscila entre 40 e 41°C, sendo esta temperatura mantida por reações homeostáticas que equilibram a produção de calor gerada pelos processos metabólicos dos principais órgãos do corpo e a dissipação deste para o ambiente (Sellier *et al.* 2014). Aves sujeitas as altas temperaturas ambientais apresentam diminuição do consumo de ração, aumento da ingestão hídrica e alterações de comportamento tornando-se prostradas e ofegantes, mantendo as asas elevadas, a região ventral exposta, as penas eriçadas e o bico entreaberto (sinais estes observados nas aves do presente estudo). Tais modificações favorecem a vasodilatação periférica que intensifica o fluxo sanguíneo para a superfície corporal (Lara e Rostagno 2013; Tan

et al. 2010).

Neste trabalho, a manutenção da temperatura corporal foi aferida por duas vias, uma introduzida cirurgicamente na cavidade celomática em contato direto com órgãos internos como intestino (via probe) e a outra por via retal com a introdução de termômetro na cloaca. Com a utilização das probes implantadas cirurgicamente, a temperatura corporal foi aferida de maneira mais precisa, revelando que nas primeiras horas do estresse por calor ocorre maior alteração da temperatura interna e, posteriormente, embora a temperatura permaneça acima da temperatura de homeostase, o organismo tende a manter a temperatura interna mais constante. Provavelmente esse comportamento esteja relacionado a mecanismos bioquímicos e moleculares que evitam o colapso orgânico.

Estudos comprovam que ambientes cuja temperatura excede 30°C predisõem o aparecimento de diversos distúrbios metabólicos em frangos de corte (Silva *et al.* 2007; Brossi *et al.* 2009; Han *et al.* 2010). Desta forma, pequenas oscilações na temperatura corporal provocadas por fatores ambientais são rigorosamente controladas pelo ritmo biológico que regula o metabolismo a fim de manter a homeostase corporal (Miyasako *et al.* 2007). Quando os mecanismos primários de dissipação de calor (radiação, condução e convecção) falham, ocorre a ativação de mecanismo latente que provoca a elevação da frequência cardiorrespiratória, aumento no débito cardíaco, aumento do fluxo sanguíneo e vasodilatação cutânea (McCafferty *et al.* 2017).

Considerando a ocorrência do aumento da frequência cardiorrespiratória, do débito cardíaco, do fluxo sanguíneo e da motricidade vascular, este estudo avaliou a influência do aumento da temperatura ambiental sobre alguns parâmetros morfométricos do coração e da artéria aorta. De fato, o aumento da pressão arterial sistêmica tem sido apontado como uma das mais importantes adaptações fisiológicas associadas à hipertermia (Chen *et al.* 2010; Tuleta *et al.* 2011). Neste sentido, estudos têm demonstrado que a manutenção da pressão arterial e da integridade vascular é mantida por adaptações estruturais e funcionais nos órgãos do sistema circulatório e que a não adaptação pode predispor o organismo a distúrbios cardiovasculares (Cheng e Su 2010; Cui e Sinoway 2014; Liu *et al.* 2015). Assim, pode-se inferir que as modificações morfométricas referentes à espessura da parede e dos diâmetros látero lateral e ântero posterior da artéria aorta identificadas no presente estudo sejam entendidas como adaptações induzidas pelo estresse por calor no período ao qual as aves foram submetidas.

Além de modificações morfológicas, alterações na temperatura corporal visceral podem modificar mecanismos bioquímicos e fisiológicos, comprometendo o funcionamento metabólico e enzimático do organismo (Giloh *et al.* 2012; Zaboli *et al.* 2017). Desta forma, incidências de distúrbios metabólicos celulares de origem cardiovascular podem estar relacionadas ao desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e a superprodução de espécies reativas de oxigênio. Todavia, a ativação de tais sistemas antioxidantes depende, dentre outros fatores, do tempo e da intensidade da exposição ao fator estressor (Akbarian *et al.* 2016; Rani *et al.* 2016). Talvez por esse motivo nossos resultados não tenham mostrado diferença significativa quanto às atividades das enzimas SOD, CAT, GSH, MPO e NAG mensuradas no coração de frangos de corte ao final do período de 12 horas de estresse por calor. Todavia, embora nenhuma destas enzimas tenham apresentado efeito significativo, não significa que esses sistemas de defesa não estejam respondendo ao desafio por calor, as atividades das enzimas podem ter ocorrido anteriormente do horário analisado.

Adicionalmente, o desequilíbrio geral entre os sistemas antioxidantes e a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) está relacionado à peroxidação lipídica cuja ocorrência gera ampla variedade de produtos resultantes da oxidação celular, dentre os quais se destacam os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (Altan *et al.* 2003; Rani *et al.* 2016). Tais compostos predisõem a desestruturação da membrana lipídica celular e esse distúrbio tem sido associado aos vários problemas cardiovasculares (Yin *et al.* 2011). De fato, nossos resultados mostraram correlação direta entre a manutenção dos frangos de corte em ambiente de estresse térmico agudo e a maior produção de ROS e LOOH pelas células cardíacas. Diversos mecanismos atuam a fim de amenizar a ocorrência de distúrbios metabólicos de origem cardiovascular os quais incluem, além dos sistemas antioxidantes, a bioatividade do óxido nítrico (NO) proveniente do endotélio vascular (Li e Förstermann 2013). No sistema cardiovascular, por exemplo, o NO apresenta efeitos benéficos como vasodilatação, ação anti-inflamatória, anticoagulante, pró-fibrinolítica, inibidora de agregação e adesão de plaquetas e leucócitos. Além disso, ele reduz a expressão de genes pró-inflamatórios (Förstermann 2006) e está relacionado com as vias termorreguladoras (Schmid e Riedel 1998; Gerstberger 1999; Alberghina *et al.* 2015).

No presente estudo, verificou-se que as aves submetidas ao estresse térmico tiveram menor dosagem de NO no tecido cardíaco quando comparadas àquelas mantidas em conforto térmico. Existem três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) as quais

desempenham funções importantes e independentes: a neuronal (nNOS) - expressa em neurônios específicos do sistema nervoso central, a endotelial (eNOS) - um vasodilatador fisiológico, e a induzível (iNOS) - relacionada ao sistema imunológico das células endoteliais, da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos. O aumento na expressão da iNOS induzido pelo estresse térmico está relacionado à resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas como interleucina 1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Förstermann e Sessa 2011). Dessa forma, o estresse térmico faz com que haja o comprometimento da enzima responsável pela síntese do NO, fazendo com que a função cardioprotetora atribuída ao NO seja severamente comprometida (Alberghina *et al.* 2015).

O NO se relaciona às vias termorreguladoras (Schmid e Riedel 1998; Gerstberger 1999; Alberghina *et al.* 2015) e por isso exerce controle indireto sobre a pressão arterial. O controle mais específico da pressão arterial é desempenhado, dentre outros fatores, pelo sistema renina-angiotensina (Li e Förstermann 2013) o qual adicionalmente relaciona-se à homeostase hidroeletrolítica por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Sparks *et al.* 2014). Por isso, vários órgãos (incluindo coração, rins, cérebro e vasos sanguíneos) apresentam o sistema renina-angiotensina bastante ativo com o intuito de aumentar a disponibilidade de angiotensina II. Isto porque este hormônio desempenha importante papel na homeostase cardiovascular contribuindo na remodelação cardíaca e vascular em condições patológicas (Urata *et al.* 1995).

Nossos resultados mostraram aumento nos níveis de mRNA do gene da ECA em função do estresse térmico agudo. Embora a princípio isso pareça benéfico, há de considerar o fato que o estresse térmico altera gravemente o equilíbrio hidroeletrolítico (Fischer da Silva *et al.* 1994). Assim, o aumento inadequado da ECA seguido por maior produção de angiotensina II pode favorecer o aparecimento de hipertensão arterial e o aumento da morbidade e mortalidade de origem cardiovascular. Tal fato ocorre em função da angiotensina II ativar moléculas de sinalização em várias vias celulares importantes, incluindo a transcrição de quinases, ativação das citocinas, integrinas e moléculas de adesão, resultando em processos inflamatórios (Zablocki e Sadoshima 2013).

Considerando que os processos inflamatórios podem estar associados ao aparecimento de distúrbios cardiovasculares (Maulik e Das 2002), algumas enzimas com elevado poder pró-inflamatório devem ser criteriosamente monitoradas. Um

exemplo é a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) cuja ação é considerada pró-aterogênica. Esta enzima age transferindo o colesterol esterificado das lipoproteínas de alta densidade (HDL) enquanto recebe triglicerídeos provenientes das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), intermédia densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) (Nicholls *et al.* 2011).

Nossos resultados mostraram maior expressão do gene da *CETP* em aves mantidas em ambiente de estresse térmico. Assim, pode-se supor que nestes animais houve diminuição do HDL cujas funções incluem ação antiaterogênica e estimuladora da atividade da enzima eNOS. Por outro lado, esta condição aumenta progressivamente o LDL, que está relacionado a múltiplas propriedades aterogênicas, pró-inflamatórias, imunogênicas, apoptóticas e citotóxicas. Tais fatores em associação podem elevar os índices de doenças cardiovasculares e a mortalidade dos animais (Li *et al.* 2017).

Conclusão

Constatou-se que a temperatura corporal dos frangos de corte variou em função da temperatura ambiente quando aferida via probe e via retal. Houve aumento da espessura da parede da artéria aorta e diminuição de seus diâmetros látero lateral e ântero posterior, aumento na dosagem de LOOH, na quantificação do ROS e diminuição na dosagem de NO, aumento na expressão gênica da *iNOS*, *ECA* e do *CETP*. Assim, pode-se concluir que de fato o estresse térmico agudo (32°C; 12 horas) foi capaz de promover diversas alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares no coração e na artéria aorta de frangos de corte.

Referências

Aebi H(1984) Catalase. *Methods Enzymol*, **105**, 121–126

Akbarian A, Michiels J, Degroote J, Majdeddin M, Golian A Smet S (2016) Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of animal science and biotechnology*, **7(1)**, 7-37. doi: [10.1186/s40104-016-0097-5](https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5)

- Alberghina D, Piccione G, Amorini AM, Lazzarino G, Congiu F, Lazzarino G, Tavazzi B (2015) Body temperature and plasma nitric oxide metabolites in response to standardized exercise test in the athletic horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, **35(9)**, 709-713. doi: [10.1016/j.jevs.2015.06.021](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.06.021)
- Altan Ö, Pabuçcuoğlu A, Altan A, Konyalıoğlu S, Bayraktar H (2003) Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British poultry science*, **44(4)**, 545-550. doi: [10.1080/00071660310001618334](https://doi.org/10.1080/00071660310001618334)
- Bailey PJ (1988) Sponge implants as models. In *Methods in enzymology*. **162**, 327-334
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, **78**, 206–209.
- Brandt R, Keston AS (1965) Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: a stable reagent for fluorometric analysis. *Analytical biochemistry*, **11(1)**, 6-9.
- Brossi C, Contreras-Castilho CJ, Amazonas EA, Mente JFM (2009) Heat stress during the pre-slaughter on broiler chicken. *Ciência Rural* **39**, n.4, p.1296-1305. doi: [10.1590/S0103-84782009005000039](https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000039)
- Chen F, Wang Y, Lee Cham J, Badoer E (2010) Inhibition of nitric oxide synthase in the paraventricular nucleus prevents the hyperthermia-induced reduction of mesenteric blood flow in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **299(2)**, R596-R602. doi: [10.1152/ajpregu.00003.2010](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00003.2010)
- Cheng X, Su H (2010) Effects of climatic temperature stress on cardiovascular diseases. *European Journal of Internal Medicine*, **21(3)**, 164-167. doi: [10.1016/j.ejim.2010.03.001](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2010.03.001)
- Cui J, Sinoway LI (2014) Cardiovascular responses to heat stress in chronic heart

failure. *Current heart failure reports*, **11(2)**, 139-145. doi: [10.1007/s11897-014-0191-y](https://doi.org/10.1007/s11897-014-0191-y)

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM (1989) Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and actions*, **26(3-4)**, 335-341.

Fischer da Silva AV, Flemming JS, Franco SG (1994) Utilização de diferentes sais na prevenção do estresse calórico de frangos de corte criados em clima quente. *Revista Setor de Ciências Agrárias*, **13**, 287-292.

Förstermann U (2006) Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biological chemistry*, **387(12)**, 1521-1533. doi: [10.1515/BC.2006.190](https://doi.org/10.1515/BC.2006.190)

Förstermann U, Sessa WC (2011) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, **33(7)**, 829-837. doi: [10.1093/eurheartj/ehr304](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304)

Gasparino E, Del Vesco AP, Voltolini DM, Nascimento CD, Batista E, Khatlab AS, Guimarães SEF (2014) The effect of heat stress on GHR, IGF-I, ANT, UCP and COXIII mRNA expression in the liver and muscle of high and low feed efficiency female quail. *British poultry science*, **55(4)**, 466-473. doi: [10.1080/00071668.2014.925090](https://doi.org/10.1080/00071668.2014.925090)

Gerstberger R (1999) Nitric oxide and body temperature control. *News Physiol Sci* **14**, 30–36. doi: [10.1152/physiologyonline.1999.14.1.30](https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1999.14.1.30)

Giloh M, Shinder D, Yahav S (2012) Skin surface temperature of broiler chickens is correlated to body core temperature and is indicative of their thermoregulatory status. *Poultry Science*, **91(1)**, 175-188. doi: [10.3382/ps.2011-01497](https://doi.org/10.3382/ps.2011-01497)

Gous RM, Morris TR (2005) Nutritional interventions in alleviating the effects of high temperatures in broiler production. *World's Poultry Science Journal*, **61(3)**, 463-475. doi: [10.1079/WPS200568](https://doi.org/10.1079/WPS200568)

- Han AY, Zhang MH, Zuo XL, Zheng SS, Zhao CF, Feng JH, Cheng C (2010) Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broiler chickens. *Poultry science*, **89(10)**, 2063-2070. doi: [10.3382/ps.2010-00715](https://doi.org/10.3382/ps.2010-00715)
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, **26(10)**, 853-856. doi: [10.1007/BF02536169](https://doi.org/10.1007/BF02536169)
- Lara LJ, Rostagno MH (2013) Impact of heat stress on poultry production. *Animals*, **3(2)**, 356-369. doi: [10.3390/ani3020356](https://doi.org/10.3390/ani3020356)
- Li H, Förstermann U (2013) Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, **13(2)**, 161–167. doi: [10.1016/j.coph.2013.01.006](https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.01.006)
- Li X, Liu X, Zhang P, Feng C, Sun A, Kang H, Fan Y (2017) Numerical simulation of haemodynamics and low-density lipoprotein transport in the rabbit aorta and their correlation with atherosclerotic plaque thickness. *Journal of The Royal Society Interface*, **14(129)**, 20170140. doi: [10.1098/rsif.2017.0140](https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0140)
- Liu CY, Chen D, Bluemke DA, Wu CO, Teixido-Tura G, Chugh A, Hundley WG (2015) Evolution of aortic wall thickness and stiffness with atherosclerosis: long-term follow up from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertension*, **65(5)**, 1015-1019. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05080](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05080)
- Maulik N, Das DK (2002) Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, **33(8)**, 1047-1060. doi: [10.1016/S0891-5849\(02\)01005-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01005-5)
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, **47(3)**, 469-474.

- Miyasako Y, Umezaki Y, Tomioka K (2007) Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *Journal of biological rhythms*, **22(2)**, 115-126.
- McCafferty DJ, Pandraud G, Gilles J, Fabra-Puchol M, Henry PY (2017) Animal thermoregulation: a review of insulation, physiology and behaviour relevant to temperature control in buildings. *Bioinspiration & biomimetics*, **13(1)**, 011001. [doi: 0000-0002-3079-3326](https://doi.org/10.1001/0000-0002-3079-3326)
- Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJ, Krueger KA, Wang MD, Shao M, Nissen SE (2011) Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *Jama*, **306(19)**, 2099-2109. [doi: 10.1001/jama.2011.1649](https://doi.org/10.1001/jama.2011.1649)
- Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Sakai M, Sá LRM, Palermo-Neto J (2010) Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science*, **89(9)**, 1905-1914. [doi: 10.3382/ps.2010-00812](https://doi.org/10.3382/ps.2010-00812)
- Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC (2016) Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences*, **148**, 183-193. [Doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002)
- Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes D C, Ferreira AS, Barreto SLT (2011) Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. 3th. ed. (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.)
- Sahraei M (2014) Effects of feed restriction on metabolic disorders in broiler chickens: a review. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **30(1)**, 1-13. [doi: 10.2298/BAH1401001S](https://doi.org/10.2298/BAH1401001S)
- Schmid HA, Riedel W, Simon E (1998) Role of nitric oxide in temperature regulation. In *Progress in brain research*, **115**, 87-110. [doi: 10.1016/S0079-6123\(08\)62031-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62031-2)

- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, **25**, 192-205.
- Sellier N, Guettier E, Staub C (2014) A review of methods to measure animal body temperature in precision farming. *American Journal of Agricultural Science and Technology*, **2(2)**, 74-99. hal-01512238
- Silva MD, Barbosa Filho JAD, Silva CD, Rosário MFD, Silva ID, Coelho AAD, Savino VJM (2007) Avaliação do estresse térmico em condição simulada de transporte de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **36(4)**, 1126-1130.
- Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsov M, Coffman TM (2011) Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, **4(3)**, 1201-1228. doi: [10.1002/cphy.c130040](https://doi.org/10.1002/cphy.c130040)
- Statistical Analyses System - SAS. *SAS/STAT 2004*: version 9.1 Cary: 2004.
- Tan GY, Yang L, Fu YQ, Feng JH, Zhang MH (2010) Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. *Poultry Science*, **89(1)**, 115-122. doi: [10.3382/ps.2009-00318](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00318)
- Tickle PG, Paxton H, Rankin JW, Hutchinson JR, Codd JR (2014) Anatomical and biomechanical traits of broiler chickens across ontogeny. Part I. Anatomy of the musculoskeletal respiratory apparatus and changes in organ size. *PeerJ*, **2**, e432. doi: [10.7717/peerj.432](https://doi.org/10.7717/peerj.432)
- Tiwari V, Kuhad A, Chopra K (2011) *Emblica officinalis* corrects functional, biochemical and molecular deficits in experimental diabetic neuropathy by targeting the oxido-nitrosative stress mediated inflammatory cascade. *Phytotherapy research*, **25(10)**, 1527-1536. doi: [10.1002/ptr.3440](https://doi.org/10.1002/ptr.3440)
- Tuleta I, Bauriedel G, Peuster M, Andrié R, Pabst S, Nickenig G, Skowasch D (2011)

FKBP12+ S100+ Dendritic Cells as Novel Cellular Targets for Rapamycin in Post Stent Neointima. *J Clin Exp Cardiol* **2**, 141. doi: [10.1159/000110417](https://doi.org/10.1159/000110417)

Urata H, Nishimura H, Ganten D (1995) Mechanisms of angiotensin H formation in humans. *European heart journal*, **16**, 79-85. doi: [10.1093/eurheartj/16.suppl_N.79](https://doi.org/10.1093/eurheartj/16.suppl_N.79)

Warholm M, Guthenberg C, Von Bahr C, Mannervik B (1985) Glutathione transferases from human liver. In *Methods in enzymology* , **113**, 499-504.

Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, **111**(10), 5944-5972. doi: [10.1021/cr200084z](https://doi.org/10.1021/cr200084z)

Zaboli GR, Rahimi S, Shariatmadari F, Torshizi MAK, Baghbanzadeh A, Mehri M (2016) Thermal manipulation during Pre and Post-Hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry science*, **96**(2), 478-485. doi: [10.3382/ps/pew344](https://doi.org/10.3382/ps/pew344)

Zablocki D, Sadoshima J (2013) Angiotensin II and oxidative stress in the failing heart. *Antioxidants & redox signaling*, **19**(10), 1095-1109. doi: [10.1089/ars.2012.4588](https://doi.org/10.1089/ars.2012.4588)

V Expressão de genes reguladores do processo de apoptose e antioxidantes no coração de frangos de corte alimentados com dipeptídeo (DL-Metionil-DL-Metionina) submetidos ao estresse térmico agudo
(*Animal Production Science*)

Resumo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de dipeptídeo de metionina (DL-Metionil-DL-Metionina) em dietas para frangos de corte e verificar seus efeitos sobre a expressão dos genes de sinalização da apoptose [proteína do choque térmico kDa 70 (*HSP 70*), caspase 3 (*CASP3*), célula-B de linfoma 2 (*BCL2*) e proteína X associada ao BCL2 (*BAX*)], sobre genes do sistema antioxidante [superóxido dismutase (*SOD*) e glutatona peroxidase 3 (*GPX3*)] e sobre a morfometria do coração em condições de estresse térmico agudo por 24 horas. Foram utilizados 90 frangos de corte distribuídos em esquema fatorial 3x2: três tratamentos relacionados à suplementação de metionina (sem suplementação de metionina, suplementação do nível recomendado de DL-metionina e suplementação de metionina na forma de dipeptídeo) e dois ambientes térmicos (temperatura de conforto a 18°C e de estresse por calor a 38°C). Houve efeito de interação entre dieta e ambiente para a expressão dos genes *BCL2* e *BAX*, resultando em efeito protetor para as células cardíacas. De igual modo, houve efeito significativo ($P < 0,05$) na expressão dos genes do sistema antioxidante com interação entre ambiente e dieta e em relação à morfometria do coração para as medidas relacionadas à espessura dos ventrículos direito e esquerdo, e dos septos interventriculares. A suplementação de metionina na forma de DL-metionina e DL-Metionil-DL-Metionina proporcionou melhor desempenho das aves, atenuou a perda de peso em situações de estresse térmico e foi responsável por tornar os mecanismos de proteção cardíaca mais eficientes em situação de elevada temperatura.

Palavras-chave: avicultura, células cardíacas, morte celular.

Introdução

O frango de corte é um animal doméstico, geneticamente aprimorado para o rápido crescimento e deposição de tecido muscular (Havenstein *et al.* 2003). Embora este aprimoramento seja essencial à produção animal, melhorias no sistema cardiovascular não ocorrem simultaneamente ao crescimento corpóreo das aves, fazendo com que o coração destes animais tenha elevada carga de trabalho. Assim, o pequeno tamanho do órgão em relação ao crescente peso corporal torna os frangos suscetíveis à insuficiência cardíaca por diferentes fatores (Kumari *et al.* 2016). Dentre estes, o estresse térmico é um dos mais relevantes, impactando negativamente os índices zootécnicos em decorrência da elevada mortalidade (Quinteiro-Filho *et al.* 2010).

A modificação da dieta através da inclusão de nutrientes com potencial terapêutico é uma estratégia fundamental para a prevenção e regressão de doenças cardiovasculares. O estudo da associação entre dieta e doenças cardiovasculares concentra-se na análise de nutrientes e compostos bioativos (Anand *et al.* 2015) e na utilização de alimentos funcionais baseados em suas funções nutricionais básicas as quais podem diminuir o risco de doenças crônicas e gerar inúmeros benefícios fisiológicos (Asgary *et al.* 2018).

A metionina é um aminoácido essencial considerado o primeiro limitante nas dietas das aves, pois é essencial para a manutenção do crescimento e de outras funções metabólicas, favorecendo inclusive o máximo potencial genético. Isto porque relaciona-se com a regulação celular e à expressão do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) (Del Vesco *et al.* 2013). Além disso, possui a capacidade de atuar como antioxidante por meio do sistema da glutathiona (Zhang *et al.* 2015), protegendo células cardíacas contra danos provocados por espécies reativas de oxigênio (ROS) as quais podem desencadear apoptose celular (Baines e Molkentin 2009).

Normalmente, a metionina é suplementada nas dietas sob a forma de aminoácidos industriais, DL-metionina e metionina hidroxí-análoga (MHA). Suas diferentes fontes possuem estruturas e características químicas distintas até a absorção e conversão em L-metionina pelas vias metabólicas (Agostini *et al.* 2016). Outra possibilidade é a utilização de dipeptídeos de metionina que, em função de transportador específico, permite maior velocidade de transporte do dipeptídeo e maior eficiência energética em relação à absorção de aminoácido livre (Gilbert *et al.* 2008).

O efeito da suplementação de metionina na forma de DL-Metionil-DL-Metionina sobre a expressão de genes apoptóticos em frangos de corte até o momento não tem sido

encontrado na literatura, sendo os resultados encontrados nesse estudo um ponto de partida para novos trabalhos. Devido à importância da metionina para o desenvolvimento corporal e suas propriedades antioxidantes, o objetivo desse trabalho foi avaliar uma nova fonte de metionina, o dipeptídeo DL-Metionil-DL-Metionina, em dietas para frangos de corte e verificar seus efeitos sobre a expressão dos genes de apoptose (*HSP70*, *CASP3*, *BCL2* e *BAX*), sobre os genes do sistema antioxidante (*SOD* e *GPX3*) e sobre a morfometria do coração em condições de estresse térmico agudo de 38°C por 24 horas.

Material e métodos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob o processo nº.4000170615.

Para sua execução, foram utilizados 90 frangos de corte machos (Cobb 500) de um dia de idade. As aves foram distribuídas em gaiolas metálicas (5 animais/gaiola), em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2 (n=6): três tratamentos relacionados à suplementação de metionina (sem suplementação de metionina, SM; DL-metionina suplementada em nível recomendado, DL-Met; metionina suplementada na forma de dipeptídeo, DL-MMet) e duas temperaturas ambientais (ambiente de conforto a 18°C e ambiente de estresse a 38°C).

Vale ressaltar que as aves foram criadas em conforto térmico (de acordo com o guia da linhagem Cobb) até os 44 dias de idade, quando 45 animais (15 de cada dieta) foram submetidos ao estresse térmico de 38°C por 24 horas e os outros 45 frangos foram mantidos em temperatura de conforto.

As dietas experimentais (1 a 21 e 21 a 45 dias) foram formuladas conforme Rostagno *et al.* (2011) com exceção dos níveis de metionina utilizados (Tabela 1). Em todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água fresca e ração e após este período as mesmas foram eutanasiadas por deslocamento cervical aos 45 dias de idade.

Tabela 1. Planos Nutricionais Experimentais

Análise da composição (%)	1-21 dias			22-45 dias		
	SM	DL-Met	DL-MMet	SM	DL-Met	DL-MMet
Proteína bruta	21,5	22	22	19,5	19,5	19,5
Lisina	1,28	1,29	1,27	1,15	1,14	1,13
Met+Cis	0,59	0,91	0,93	0,59	0,89	0,88
Treonina	0,85	0,84	0,84	0,75	0,76	0,74
Valina	1,04	1,03	1,02	0,93	0,94	0,93
Isoleucina	0,95	0,94	0,93	0,85	0,85	0,84
Arginina T	1,45	1,43	1,41	1,28	1,27	1,26

Desempenho e peso relativo

Os animais foram pesados semanalmente durante todo período experimental (1-45 dias). O ganho de peso médio das aves divididas de acordo a suplementação de metionina foi determinado pela diferença entre o peso final e o peso inicial. O consumo total de ração foi calculado a partir da diferença entre a quantidade da ração fornecida e as sobras. A conversão alimentar foi obtida pela razão entre a quantidade da ração ingerida e o ganho de peso.

Como o peso do coração pode variar de acordo com o peso dos animais, foi calculado o peso relativo do coração (PRCOR), pela equação $PRCOR = (\text{peso do coração} / \text{peso vivo}) * 100$.

Morfometria do coração

Após o abate, as aves foram submetidas à toracotomia, à abertura do pericárdio fibroso e à remoção cirúrgica do órgão por meio de uma incisão sobre os grandes vasos da base. O coração foi imediatamente pesado em uma balança analítica (Shimadzu®) e perfundido com solução de Tampão Fosfato Salino (PBS; 0,1 M; pH 7,4) através do tecido miocárdico para completa remoção do sangue alojado em suas câmaras.

Na sequência, os corações foram cortados imediatamente abaixo do septo atrioventricular e o tecido cardíaco acima deste septo foi utilizado para as análises morfométricas do coração. Assim, os átrios foram prontamente fixados em paraformaldeído a 4% durante 72 horas e posteriormente armazenados em álcool a 70%.

Os átrios previamente armazenados foram utilizados para a captura de imagens que serviram para mensuração das câmaras cardíacas (diâmetros látero lateral e ântero

posterior dos átrios, espessura das paredes atriais direita e esquerda, e espessura do septo interatrial) de acordo com a metodologia proposta por McGovern *et al.*(1999).

Para a captura das imagens, uma lupa (Motic® TIM-2B) acoplada a uma câmara (OPTON®) foi utilizada. A morfometria do coração foi realizada através da análise de imagens digitais usando um analisador de imagens computadorizadas (IMAGE PROPLUS 5.2 da Media Cybernetics, São Paulo, Brasil). A calibração para padronização das imagens foi feita a partir de uma tira de calibração de 7500 µm.

Expressão Gênica

Amostras do tecido do coração foram coletadas, imediatamente conservadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi isolado com uso do reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific™) no comprimento de onda de 260 nm e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Essa etapa foi realizada para remoção de possível contaminação com DNA genômico.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizou-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) e as reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante. Logo após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes: caspase 3 (*CASP3*), célula-B de linfoma 2 (*BCL2*), Proteína X associada ao BCL2 (*BAX*), proteína do choque térmico 70 kDa (*HSP70*), superóxido dismutase (*SOD*), glutationa peroxidase 3 (*GPX3*) depositadas no site www.ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 2).

Foi realizado o teste de eficiência para todos os *primers*. Como controle endógeno utilizou-se o gene β -actina. Todas as análises foram realizadas em um volume final de 25 μ L e em duplicatas.

Tabela 2. Sequências de *primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR)

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Número de acesso	Amplicon (pb)	Referencia
<i>CASP3</i>	F-TGGTATTGAAGCAGACAGTGGA R-GGAGTAGTAGCCTGGAGCAGTAGA	NM_204725.1	160	Zuniga <i>et al.</i> 2018
<i>BCL2</i>	F-GCTTTATCCTCCTGCCCTC R-CCTTTTTCCTCCACCCTGTT	NM_205339.1	145	Seo <i>et al.</i> 2011
<i>BAX</i>	F-TATGGGACACCAGGAGGGTA R-CGTAGACCTTGCGGATAAAGC	XM_001235092.4	158	Xu <i>et al.</i> 2017
<i>HSP70</i>	F-CGGGCAAGTTTGACCTAA R-TTGGCTCCCACCCTATCTCT	NM_001006685.1	250	Zhao <i>et al.</i> 2014
<i>SOD</i>	F-AGATGGCAGTGGGAAATGAG R-ACTCAAGACAGCAGAGTAGTAATG	NM_205064	110	Araújo <i>et al.</i> 2015
<i>GPX3</i>	F-GGAGAGGGAGAAGGTGAAATG R-TGGCCACGTTGACAAAGA	NM_001163232.2	137	Araújo <i>et al.</i> 2015
β -actina	F-GCCAACAGAGAGAAGATGAC R-CACCAGAGTCCATCACAATAC	L08165	130	

Análise estatística

O método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para as análises de expressão gênica relativa, sendo seus resultados expressos como unidade arbitrária (UA). Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando o procedimento GLM do SAS (2010) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados

Ao analisar o consumo diário de ração no período de 24 horas pode ser verificado que houve diferença ($P < 0,05$) para ambiente no qual, os animais submetidos ao estresse térmico tiveram menor consumo, independente da dieta fornecida. Porém, ao se relacionar o ganho de peso durante o mesmo período, pode-se observar que os

animais que receberam as dietas suplementadas com DL-Met e DL-MMet no ambiente de conforto térmico apresentaram maior ganho de peso ($P < 0,0001$) em relação aos animais que receberam a dieta não suplementada com metionina. Além disso, no ambiente de estresse térmico, o tratamento sem a dieta suplementada apresentou de forma significativa a maior perda de peso em relação aos demais tratamentos (Fig 1.).

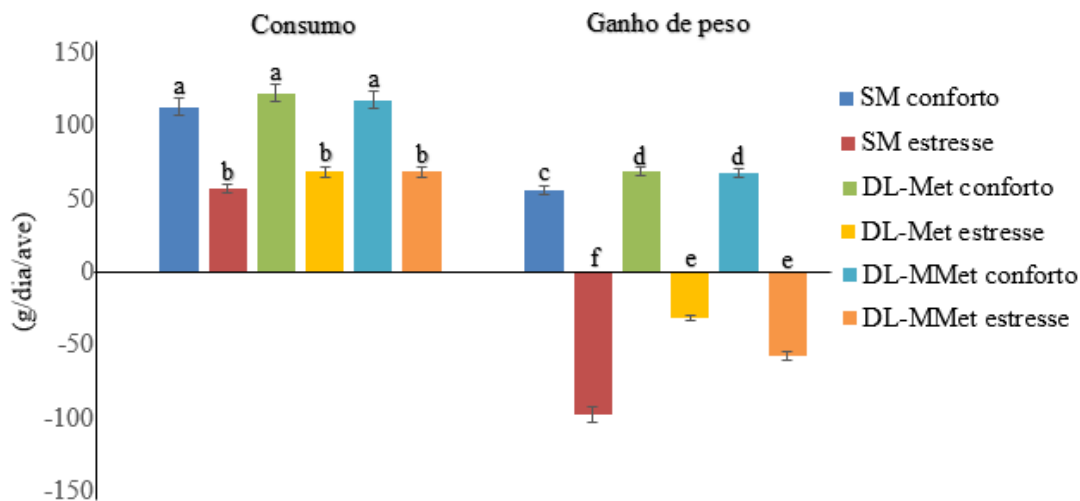


Fig 1. Consumo de ração e ganho de peso médio diário de frangos de corte com 45 dias mantidos em conforto térmico e submetidos às 24 horas de estresse térmico. ^{a,b,c, d, e, f} Valores médios significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Foi observada alteração no peso relativo do coração (PRCOR) das aves com efeito de interação entre ambiente e dieta ($P = 0,0225$), de forma que foi identificado menor peso relativo nos animais submetidos ao estresse e recebendo a dieta suplementada com DL-MMet (Tabela 3).

Em relação à morfometria do coração apresentada na Tabela 4, pode-se observar que as medidas relacionadas a parede ventricular direita ($P = 0,0001$), esquerda ($P = 0,0105$) e septo interventricular ($P = 0,0206$) apresentaram interação entre dieta e ambiente. Assim, animais submetidos ao estresse térmico e alimentados com DL-MMet apresentaram aumento na espessura da parede ventricular direita (4157 μm) e esquerda (6955 μm), com redução na espessura do septo interventricular (5855 μm).

Por fim, os resultados da expressão dos genes associados a apoptose (*CASP3*, *BCL2*, *BAX* e *HSP70*) e dos genes do sistema antioxidante (*SOD* e *GPX3*) no coração de frangos de corte estão apresentados na Tabela 5. Os genes *BCL2* ($P = 0,015$), *BAX* ($P = 0,032$), *HSP70* ($P = 0,005$), *SOD* ($P = 0,017$) e *GPX3* ($P = 0,019$) avaliados neste estudo tiveram suas expressões afetadas pela interação entre ambiente e dieta. Já o gene *CASP3*

teve sua expressão afetada de forma significativa apenas para o ambiente (P=0,001).

Tabela 3. Peso corporal e peso relativo do coração de frangos de corte com 45 dias

Ambiente	Dieta	PC(kg)		PRCOR (%)	
		Média	DP	Média	DP
Conforto	SM	2,233	0,242	0,527 ^{ab}	0,038
	DL-Met	2,813	0,538	0,467 ^c	0,011
	DL-MMet	3,163	0,545	0,546 ^a	0,042
Estresse	SM	2,443	0,473	0,480 ^{bc}	0,020
	DL-Met	2,743	0,283	0,417 ^{cd}	0,030
	DL-MMet	2,813	0,171	0,407 ^d	0,011
Efeitos Principais					
Ambiente	Conforto	2,736	0,5710	0,5130	0,0460
	Estresse	2,667	0,3350	0,4340	0,0390
Dieta	SM	2,338 ^b	0,3555	0,5030	0,0370
	DL-Met	2,778 ^a	0,3860	0,4420	0,0340
	DL-MMet	2,988 ^a	0,4090	0,4770	0,0810
Probabilidade					
	Ambiente	0,7195		<,0001	
	Dieta	0,0454		0,0087	
	Interação	0,5062		0,0225	

Peso Corporal (PC), Peso Relativo do coração (PRCOR), Desvio-padrão (DP). ^{a,b,c,d}Valores médios dentro de uma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P <0,05).

Tabela 4. Morfometria do coração de frangos de cortes com 45 dias de idade

Ambiente	Dieta	DLL (μm)		DAP (μm)		PVD (μm)		PVE(μm)		SIV(μm)	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Conforto	SM	19724	937	23783	1301	2734 ^c	144	6048 ^{cd}	359	6749 ^a	384
	DL-Met	17978	1668	23392	1723	3496 ^b	283	7549 ^a	619	6009 ^b	829
	DL-MMet	19400	995	24613	2280	2795 ^c	473	5481 ^d	1220	6869 ^a	664
Estresse	SM	18970	602	23934	603	3622 ^{ab}	535	6450 ^{bc}	297	6690 ^a	763
	DL-Met	19157	357	24160	933	3384 ^b	364	6853 ^{ab}	272	6459 ^{ab}	237
	DL-MMet	19988	750	24033	2434	4157 ^a	580	6955 ^a	211	5855 ^b	174
Efeitos Principais											
Ambiente	Conforto	19034	1406	23930	1782	3009	471	6360	1181	6543	727
	Estresse	19372	715	24042	1434	3721	572	6620	300	6335	569
Dieta	SM	19382 ^{ab}	859	23852	999	3138	538	6231	379	6723	555
	DL-Met	18514 ^b	1349	23741	1412	3446	310	7233	594	6214	649
	DL-MMet	19667 ^a	902	24349	2250	3414	867	5970	1038	6408	716
Probabilidade											
Ambiente		0,3469		0,8510		<,0001		0,2503		0,3140	
Dieta		0,0324		0,6743		0,1791		<,0001		0,1344	
Interação		0,0904		0,6545		0,0001		0,0105		0,0206	

Diâmetro látero lateral (DLL), diâmetro ântero posterior (DAP), parede ventricular direita (PVD), parede ventricular esquerda (PVE), septo interventricular (SIV), Desvio-padrão (DP). ^{a,b,c,d} Valores médios dentro de uma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P <0,05).

Tabela 5. Expressão dos genes *CASP3*, *BCL2*, *BAX*, *HSP70*, *SOD* e *GPX3* no coração de frangos de corte aos 45 dias de idade

Ambiente	DIETA	<i>CASP3</i>		<i>BCL2</i>		<i>BAX</i>		<i>HSP70</i>		<i>SOD</i>		<i>GPX3</i>		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Conforto	SM	0,140	0,010	0,50 ^c	0,166	0,40 ^c	0,102	1,27 ^b	0,332	3,20 ^b	1,689	3,30 ^c	0,541	
	DL-Met	0,151	0,030	0,40 ^c	0,093	0,40 ^c	0,076	1,95 ^b	0,262	6,60 ^b	0,894	3,20 ^c	0,704	
	DL-MMet	0,110	0,022	0,40 ^c	0,078	0,50 ^c	0,082	2,20 ^b	0,522	5,56 ^b	2,213	2,30 ^c	0,809	
Estresse	SM	0,195	0,084	0,60 ^{bc}	0,586	0,80 ^b	0,194	5,89 ^b	3,304	6,60 ^b	1,821	5,20 ^b	0,648	
	DL-Met	0,255	0,090	0,90 ^a	0,162	1,40 ^a	0,469	13,17 ^a	5,566	3,80 ^b	2,298	7,50 ^a	1,387	
	DL-MMet	0,205	0,088	0,98 ^a	0,269	1,00 ^b	0,393	15,56 ^a	6,232	10,5 ^a	5,983	4,80 ^b	0,982	
Efeitos Principais														
Ambiente	Conforto	0,10 ^b	0,027	0,448	1,180	0,423	0,010	1,810	0,547	5,143	2,149	2,961	0,791	
	Estresse	0,20 ^a	0,085	0,728	0,194	1,059	0,430	11,544	6,499	6,979	4,568	5,856	1,563	
Dieta	SM	0,170	0,063	0,539	0,123	0,590	0,249	3,582	3,291	4,929	2,447	4,278	1,164	
	DL-Met	0,203	0,084	0,642	0,255	0,882	0,625	7,565	6,933	5,203	2,227	5,376	2,477	
	DL-MMet	0,158	0,078	0,583	0,244	0,751	0,376	8,884	8,115	8,051	4,987	3,572	1,560	
Probabilidade														
Ambiente		0,0012		<,0001		<,0001		<,0001		<,0001		0,0506		<,0001
Dieta		0,2630		0,2777		0,0705		0,0006		0,1035		0,0005		
Interação		0,6644		0,0150		0,0318		0,0046		0,0173		0,0189		

Caspase 3 (*CASP3*), Célula-B de linfoma 2 (*BCL2*), Proteína X associada ao Bcl-2 (*BAX*), Proteína de choque térmico 70 (*HSP70*), superóxido dismutase (*SOD*), glutatona peroxidase 3 (*GPX3*), Desvio-padrão (DP). ^{a,b,c} Valores médios dentro de uma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P <0,05).

Discussão

Este estudo avaliou os efeitos que uma dieta suplementada com nova fonte de metionina (o dipeptídeo DL-Metionil-DL-Metionina) pode exercer sobre a expressão dos genes de apoptose (*HSP70*, *CASP3*, *BCL2* e *BAX*), genes do sistema antioxidante (*SOD* e *GPX3*) e sobre a morfometria do coração de frangos de corte mantidos em condições de estresse térmico agudo (38°C) por 24 horas. Isto porque a metionina, além de propriedades antioxidantes, tem grande importância no desenvolvimento corporal e as aves apresentam dificuldade em dissipar calor, fazendo com que haja redução na produção de calor metabólico em situação de estresse térmico (Al-Tamimi 2007).

Nesta condição é comum haver redução do consumo de ração pelo animal e, em consequência, diminuição do ganho de peso (Bianchi *et al.* 2007; Lu *et al.* 2007; Sandercock *et al.* 2001). Ademais, mudanças fisiológicas adaptativas surgem como a modificação no tamanho dos órgãos a fim de reduzir a produção de calor interno, pois é sabido que o coração, juntamente com o fígado, cérebro e músculos esqueléticos são responsáveis pela maior parte da produção de calor do corpo (Guyton e Hall 2006).

Além disso, a elevação da temperatura corporal altera o fluxo sanguíneo da região central do corpo para as regiões periféricas, fazendo com que haja diminuição do volume sanguíneo torácico, inclusive para o coração e estruturas vasculares (Crandall *et al.* 2008). Por isso, tanto no presente estudo quanto nos achados de Ribeiro *et al.* (2001), o peso relativo dos corações dos frangos submetidos à elevada temperatura foi menor. Ademais, animais suplementados com DL-metionina ou com o dipeptídeo DL-Metionil-DL-Metionina tiveram maior deposição de proteína, maior peso vivo final e consequentemente menor proporção em relação ao tamanho relativo do coração.

Nossos resultados mostraram aumento na espessura das paredes ventriculares direita e esquerda, e diminuição na espessura do septo interventricular. Tal achado pode estar relacionado ao fato de que o sistema cardiovascular de frangos de corte pode estar em sobrecarga em função do rápido ganho de peso dos animais e consequente aumento na demanda sanguínea tecidual (Macari *et al.* 2004). Além disso, em condições de estresse térmico, o tamanho relativo do coração pode se tornar desproporcional em relação ao corpo, havendo diminuição da quantidade do fluxo sanguíneo e aumento compensatório da frequência cardíaca (Al-Tamimi 2007).

O controle da frequência cardíaca e, consequentemente o aumento da contração ventricular durante o estresse calórico, ocorrem pela ação direta da temperatura sobre as células nodais cardíacas (sinoatrial e atrioventricular), fazendo com que a velocidade

de condução e propagação dos impulsos nervosos no coração seja mais rápida (Crandall e Wilson 2015). Tal fato aumenta a capacidade contrátil do órgão e eleva a pressão sanguínea a fim de manter o volume sanguíneo corpóreo (Brothers *et al.* 2009). Desta forma, nossos achados sugerem que, embora o coração tenha seu volume diminuído em função do aumento da espessura das paredes ventriculares em função do estresse térmico, sua força ainda é suficiente para manter a pressão sanguínea corporal.

Adicionalmente, o estresse por calor pode desencadear desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas antioxidantes das células gerando dano oxidativo e alteração na homeostase (Mujahid *et al.* 2007). Por outro lado, mecanismos de citoproteção são ativados como, por exemplo, a resposta ao estresse térmico que desencadeia a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs) as quais protegem as células de lesões por estresse oxidativo ou ajudam a repará-las (Al-Aqil e Zulkifli 2009; Hao e Gu 2014).

Dentre as HSPs, a HSP70 tem sido extensivamente estudada pela sua resposta a diversos estressores (Dastoor e Dreuer 2000; Gabriel *et al.* 2002; Stankiewicz *et al.* 2005; Aghdassi *et al.* 2007). Além disso, vários trabalhos evidenciaram aumento significativo na sua expressão no coração de aves submetidas ao estresse térmico (Yu *et al.* 2008; Wang *et al.* 2010; Xie *et al.* 2014). Por isso, no presente estudo sua expressão foi analisada.

É sabido que a exposição as elevadas temperaturas danifica, por desnaturação, a conformação proteica, comprometendo a função das proteínas e resultando no acúmulo de proteínas incorretamente enovelada em meio intracelular. À medida que estas estruturas se acumulam, inicia-se um mecanismo universal de resposta celular ao estresse que consiste na rápida expressão da *HSP70* a qual, como mecanismo de defesa, repara proteínas defeituosas (Welch 1992). Desta forma, o aumento na expressão da *HSP70* no coração das aves sujeitas ao estresse por calor visto no presente estudo, pode estar associado à proteção miocárdica (Plumier *et al.* 1995; Amrani *et al.* 1998).

Ademais, a importância da SOD e da GPX têm sido enfatizadas no coração em função da proteção que causam no tecido cardíaco contra danos oxidativos por meio da regulação do estado redox das proteínas de superfície da membrana da célula cardíaca preservando-as (Ganesan *et al.* 2011). Além disso, a metionina promove benefícios à saúde cardiovascular pela sua ação sobre a atividade da GPX (Błaszczuk *et al.* 2010). Tal fato condiz com os resultados do presente estudo, ressaltando a potencialidade da metionina na eliminação das ROS por meio de interação com o sistema antioxidante

(Vossen *et al.* 2011) a fim de minimizar a apoptose (Moustafa *et al.* 2004).

É importante ressaltar que a apoptose é uma resposta celular fisiológica rigidamente controlada pela expressão de genes específicos os quais funcionam como um sistema de defesa em caso de dano celular. Assim, sua ocorrência é de fundamental importância na manutenção da saúde dos tecidos corpóreos (Lanneau *et al.* 2008) e pode ser desencadeada por duas vias clássicas de sinalização, a intrínseca e a extrínseca. A via extrínseca (ou receptor de morte) é desencadeada pela ligação específica dos receptores de membrana da superfamília do gene fator de necrose tumoral (TNF) que ativa a cascata das caspases (Chipuk *et al.* 2010). A via intrínseca (ou mitocondrial) é um processo bem regulado que envolve interações entre várias moléculas pró e anti-apoptóticas, está intimamente ligada à alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo C para o citosol desencadeando a ativação de proteínas caspases (Chipuk *et al.* 2010).

Existem dois tipos de caspases, as iniciadoras e as efetoras. As caspases-8 e -9 são iniciadoras e agem para iniciar e regular a apoptose, clivando proformas inativas das caspases efetoras (caspases -3 e -7) ativando-as, o que por sua vez culmina no processo de clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (Kim e Kang 2010). Tanto na apoptose mediada por receptor de morte quanto na via mitocondrial, a sinalização causa a ativação da caspase-3, que age como um efetor de apoptose por clivagem de vários substratos de proteínas e amplificando o sinal de morte da membrana plasmática ativando caspases adicionais (Mani 2008).

Embora a apoptose possa ocorrer naturalmente em todos os tipos celulares, esse processo pode ser agravante para as células cardíacas uma vez que estas possuem capacidade limitada de regeneração (Mani 2008) e qualquer estímulo estressante pode ativar a caspase-3 nas células miocárdicas (Zhang *et al.* 2017). Tal fato assente com estes resultados, pois foi observado aumento significativo da expressão do gene caspase-3 no coração de frangos de corte submetidos ao ambiente de estresse térmico.

Considerando que a homeostase tecidual depende da perfeita interação entre proliferação e morte celular, existe estreita correlação entre os genes do sistema de defesa antioxidante *GPX3* e os genes ligados à apoptose (Prashant *et al.* 2007; Sivoňová *et al.* 2007). Dessa forma, a pesquisa por novas fontes de metionina é de suma importância, uma vez que esse aminoácido sulfurado apresenta notável papel no metabolismo das proteínas (Corzo *et al.* 2006), além de atuar como precursor da glutatona que por sua vez, desempenha importante papel no armazenamento e

transporte de cisteína (Ganesan *et al.* 2011). Além disso, a glutatona pode agir como uma molécula de defesa celular contra ROS, peróxidos e xenobióticos, atuando também em conjunto com as enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPX) e glutatona transferase (GST), as quais ajudam a manter a integridade e a permeabilidade das células cardíacas minimizando a apoptose (Ganesan *et al.* 2011).

É válido destacar que o estresse térmico, além de aumentar as ROS, altera a permeabilidade da membrana mitocondrial gerando ativação da apoptose por via intrínseca através do aumento da síntese de citocromo C que age como sinalizador da pró apoptose molecular (Marchi *et al.* 2012). Como as mitocôndrias são semiautônomas por conterem seu próprio material genético, nelas estão presentes genes que codificam proteínas responsáveis pelo equilíbrio entre homeostase mitocondrial e apoptose celular. Tal equilíbrio é dado pela união das proteínas indutora (BAX) e inibidora (BCL2) de apoptose presente na membrana mitocondrial (Kwak 2013). A BCL2, por sua vez, possui capacidade de se acoplar à BAX impedindo que esta desencadeie a apoptose (Chipuk *et al.* 2010) e predispondo a sobrevivência das células cardíacas (Baines e Molckentin 2009).

Quando a relação BAX/BCL2 é aumentada, o efeito protetor da BCL2 na membrana mitocondrial é interrompido e a permeabilidade é aumentada, permitindo que o citocromo C extravase para o citosol. O citocromo C liga-se então ao fator ativador da protease apoptótica-1 (Apaf-1) formando um complexo de apoptossomo, que inicia a cascata da caspase via ativação da caspase-9 e resultando na morte celular programada por destruição enzimática de proteínas citoplasmáticas e DNA (Wilken *et al.* 2011). Tal fato gera danos irreparáveis às células cardíacas causando perda aguda e crônica de cardiomiócitos, infarto do miocárdio, doença cardíaca isquêmica, várias formas de cardiomiopatias e insuficiência cardíaca (Kang e Izumo 2000). No presente estudo, no entanto, a expressão do *BCL2* aumentou resultando em efeito protetor para as células cardíacas já que a elevada expressão do gene da *BCL2* forma heterodímeros com a BAX inibindo a indução do efeito cascata da apoptose.

No presente estudo, após o desequilíbrio provocado pelo estresse térmico, é provável que tenha ocorrido aumento na produção das ROS no coração dos frangos de corte e, como já mencionado anteriormente, como as células cardíacas apresentam limitada capacidade de regeneração, esse aumento proporcionou maior a expressão da BAX. É de conhecimento a relação da metionina com o sistema de defesa antioxidante, os animais suplementados com este aminoácido apresentaram maior crescimento, ganho

de peso e deposição proteica. Todavia, tais fatores desencadeiam aumento na velocidade do metabolismo e conseqüentemente maior produção de ROS (Del Vesco *et al.* 2013).

Conclusão

Em conjunto, os resultados mostraram que os frangos de corte submetidos ao estresse térmico apresentaram pior desempenho e maior aumento na sinalização dos genes de apoptose. Porém, a suplementação com a metionina proporcionou, de maneira independente da fonte (DL-Met e DL-MMet), melhor desempenho das aves e tornou os mecanismos de proteção cardíaca mais eficientes.

Vale ressaltar que o efeito da suplementação com metionina na forma de DL-MMet sobre a expressão de genes apoptóticos em frangos de corte não havia sido encontrado na literatura até o momento, sendo por isso os resultados deste estudo um ponto de partida para futuros estudos sobre o tema.

Referências

- Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A (2007) Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research* **67**, 616–625. doi: [10.1158/0008-5472](https://doi.org/10.1158/0008-5472)
- Agostini PS, Dalibard P, Mercier Y, Van der Aar P, Van der Klis JD (2016) Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers. *Poultry Science* **95**, 560-569. doi: [10.3382/ps/pev340](https://doi.org/10.3382/ps/pev340)
- Al-Aqil A, Zulkifli I (2009) Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. *Poultry Science* **88**, 1358–1364. doi: [10.3382/ps.2008-00554](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00554)
- Al-Tamimi HJ (2007) Thermoregulatory response of goat kids subjected to heat

Amrani M, Latif N, Morrison K, Gray CC, Jayakumar J, Corbett J, Goodwin AT, Dunn MJ, Yacoub MH (1998) Relative induction of heat shock protein in coronary endothelial cells and cardiomyocytes: implications for myocardial protection. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **115**, 200–204. doi: [10.1016/S0022-5223\(98\)70458-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70458-1)

Anand SS, Hawkes C, de Souza RJ, Mente A, Dehghan M, Nugent R, Zulyniak MA, Wies T, Bernstein AM, Krauss R, Kromhout D, Jenkins DJA, Malik V, Martinez-Gonzalez MA, Mozafarian D, Yusuf S, Willett WC, Popkin BM (2015) Food Consumption and its impact on Cardiovascular Disease: Importance of Solutions focused on the globalized food system. *Journal of the American College of Cardiology* **66(14)**, 1590-1614. doi: [10.1016/j.jacc.2015.07.050](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.07.050)

Araújo RS (2015) Expressão gênica em frangos de corte submetidos a diferentes níveis de alimentos alternativos. Dissertation (MSc), The Federal University of Viçosa, Brazil.

Asgary S, Rastqar A, Keshvari M (2018) Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 1-27. doi: [10.1080/07315724.2017.1410867](https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1410867)

Baines CP, Molkenin JD (2009) Adenine nucleotide translocase-1 induces cardiomyocyte death through upregulation of the pro-apoptotic protein Bax. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **46**, 969-977. PMID: [PMC2768428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/192768428/)

Bianchi M, Petracci F, Sirri F, Folegatti E, Franchini A, Meluzzi A (2007) The influence of the season and market class of broiler chickens on breast meat quality traits. *Poultry Science* **86**, 959- 963. doi: [10.1093/ps/86.5.959](https://doi.org/10.1093/ps/86.5.959)

Błaszczyk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S, Birkner E (2010) Influence of

- methionine upon the activity of antioxidative enzymes in the kidney of rats exposed to sodium fluoride. *Biological trace element research*, **133**(1), 60-70. doi: [10.1007/s12011-009-8412-z](https://doi.org/10.1007/s12011-009-8412-z)
- Brothers RM, Bhella PS, Shibata S, Wingo JE, Levine BD, Crandall CG (2009) Cardiac systolic and diastolic function during whole body heat stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **296**, 1150–1156. doi: [10.1152/ajpheart.01069.2008](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01069.2008)
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell* **37**, 299-310. doi: [10.1016/j.molcel.2010.01.025](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025)
- Corzo A, Kidd M, Dozier W, Shack L, Burgess S (2006) Protein expression of pectoralis major muscle in chickens in response to dietary methionine status. *British Journal of Nutrition* **95**, 703-708. PMID: [16571149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16571149/)
- Crandall CG, Wilson TE, Marving J, Vogelsang TW, Kjaer A, Hesse B, Secher NH (2008) Effects of passive heating on central blood volume and ventricular dimensions in humans. *Journal of Physiology* **586**, 293–301. doi: [10.1113/jphysiol.2007.143057](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143057)
- Crandall CG, Wislson TE (2015) Human Cardiovascular Responses to Passive Heat Stress. *Comprehensive Physiology* **5**, 17–43. doi: [10.1002/cphy.c140015](https://doi.org/10.1002/cphy.c140015)
- Dastoor Z, Dreyer JL (2000) Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *Journal of Cell Science* **113**, 2845- 2854. PMID: [10910769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10910769/)
- Del Vesco AP, Gasparino E, Oliveira Neto AR, Rossi RM, Soares MAM, Silva DSCC (2013) Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. *Livestock Science* **151**, 284-291. doi: [org/10.1016/j.livsci.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.11.005)

- Gabriel JE, Da Mota AF, Boleli IC, Macari M, Coutinho LL (2002) Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. *Growth Development, and Aging: GDA* **66**, 27–33. PMID: [12212628](#)
- Ganesan B, Buddhan S, Anandan R, Sivakumar R, Nbinezhilan AR (2011) Antioxidant defense of betaine against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Molecular Biology Report* **37**, 1319-1327. doi: [10.1007/s11033-009-9508-4](#)
- Gilbert ER, Wong EA, Webb KE Jr. (2008) Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *Journal Animal Science* **86**, 2135-2155. doi: [10.2527/jas.2007-0826](#)
- Guyton AC, Hall JE (2006) *Tratado de fisiologia médica* 11ed (Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan)
- Hao Y, Gu XH (2014) Effects of heat shock protein 90 expression on pectoralis major oxidation in broilers exposed to acute heat stress. *Poultry Science* **93**, 2709-2717. doi: [10.3382/ps.2014-03993](#)
- Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA (2003) Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* **82**, 1509-1518. doi: [10.1093/ps/82.10.1509](#)
- Joseph J, Loscalzo J (2013) Methoxistasis: Integrating the Roles of Homocysteine and Folic Acid in Cardiovascular Pathobiology. *Nutrients* **5**, 3235-3256. doi: [10.3390/nu5083235](#)
- Kang PM, Izumo S (2000) Apoptosis and heart failure: a critical review of the literature. *Circ Res* **86**, 1107-13. PMID: [10850960](#)
- Kim N-H, Kang PM (2010) Apoptosis in Cardiovascular Diseases: Mechanism and Clinical Implications. *Korean Circulation Journal* **40**, 299-305. doi: [10.4070/kcj.2010.40.7.299](#)

- Kumari A, Tripathi UK, Boro P, Sulabh S, Kumar M, Nimmanapalli R (2016) Metabolic disease of broiler birds and its management: A review. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry* **3**, 15-16.
- Kwak H-B (2013) Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of Exercise Rehabilitation* **9**, 212-219. doi: [10.12965/jer.130002](https://doi.org/10.12965/jer.130002)
- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**, 743-61. doi: [10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x)
- Lu Q, Wen J, Zhang H (2007) Effect of chronic heat exposure on fat deposition and meat quality in two genetic types of chicken. *Poultry Science* **86**, 1059–1064. doi: [10.1093/ps/86.6.1059](https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1059)
- Macari M, Furlan RL, Maiorka A (2004) Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: AA Mendes, IA Naas, M Macari Produção de frangos de corte. Campinas: Facta, 137-156.
- Mani K (2008) Programmed cell death in cardiac myocytes: strategies to maximize post-ischemic salvage. *Heart Failure Reviews* **13**, 193-209. doi: [10.1007/s10741-007-9073-7](https://doi.org/10.1007/s10741-007-9073-7)
- Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, Marchi ED, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P (2012) Mitochondria-Ros crosstalk in the control of cell death and aging. *Journal of Signal Transduction* **2012**, 1-17. doi: [10.1155/2012/329635](https://doi.org/10.1155/2012/329635)
- McGovern RH, Feddes JJ, Robinson FE, Hanson JA (1999) Analysis of right ventricular areas to assess the severity of ascites syndrome in broiler

- chickens. *Poultry science* **78**, 62-65. doi: [10.1093/ps/78.1.62](https://doi.org/10.1093/ps/78.1.62)
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas JR AJ, Agarwal A (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction* **19**, 129-138. PMID: [14688171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14688171/)
- Mujahid A, Pumford NR, Bottje W, Nakagawa K, Miyazawa T, Akiba Y, Toyomizu M (2007) Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science* **44**, 439-445. doi: [10.2141/jpsa.44.439](https://doi.org/10.2141/jpsa.44.439)
- Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, PagoulatoS GN (1995) Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 1854–1860.
- Prashant AV, Harishchandra H, D’Souza V, D’Souza B (2007) Age related changes in lipid peroxidation and antioxidants in elderly people. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **22**, 131-134. doi: [10.1172/JCI117865](https://doi.org/10.1172/JCI117865)
- Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Sakai M, Sá LRM, Palermo-Neto J (2010) Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science*, **89(9)**, 1905-1914. doi: [10.3382/ps.2010-00812](https://doi.org/10.3382/ps.2010-00812)
- Ribeiro AML, Penz AM, Teeter R (2001) Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid and DL-Methionine on broiler performance and compensatory growth after exposure to two different environmental temperatures. *Journal of Applied Poultry Research* **10**, 419- 426. doi: [10.1093/japr/10.4.419](https://doi.org/10.1093/japr/10.4.419)
- Rostagno H S, Albino L F T, Donzele J L, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes D C, Ferreira AS, Barreto S L T (2011) Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. 3th. ed. (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.)

- Sandercock DA, Hunter RR, Nute GR, Mitchell MA, Hocking PM (2001) Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: Implications for meat quality. *Poultry Science* **80**, 418-425. doi: [10.1093/ps/80.4.418](https://doi.org/10.1093/ps/80.4.418)
- SAS (2010) 'SAS users guide.' (SAS Institute: Cary, NC)
- Seo HW, Rengaraj D, Choi JW, Park Kj, Song G, Han JY (2011) The expression profile of apoptosis-related genes in the chicken as a human epithelial ovarian cancer model. *Oncology Reports* **25**, 49-56. doi: [10.3892/or-00001040](https://doi.org/10.3892/or-00001040)
- Sivoňová M, Tatarková Z, Ďuračková Z, Dobrota D, Lehotský J, Matáková T, Kaplán P (2007) Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged Rats. *Physiological Research* **56**, 757-764. PMID: [17087608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17087608/)
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD (2005) Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 38729 –38739. doi: [10.1074/jbc.M509497200](https://doi.org/10.1074/jbc.M509497200)
- Vossen E, Ntawubizi M, Raes K, Huyghebaert G, Arnouts S, Smet S (2011) Effect of dietary antioxidant supplementation on the oxidative status of plasma in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **95**, 198-205. doi: [10.1111/j.1439-0396.2010.01041](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01041)
- Xie J, Tang L, Lu L, Zhang L, Xi L, Liu HC, Odle J, Luo X (2014) Differential Expression of Heat Shock Transcription Factors and Heat Shock Proteins after Acute and Chronic Heat Stress in Laying Chickens (*Gallus gallus*). *PLoS One* **9**, e102204. doi: [10.1371/journal.pone.0102204](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102204)
- Xu D, Li B, Cao N, Li W, Tian Y, Huang Y (2017) The protective effects of

- polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) on the chicken spleen under heat stress via antagonizing apoptosis and restoring the immune function. *Oncotarget* **8**, 70394-70405. doi: [10.18632/oncotarget.19709](https://doi.org/10.18632/oncotarget.19709)
- Yu J, Bao E, Yan J, Lei L (2008) Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. *Cell Stress Society International* **13**, 327–335. doi: [10.1007/s12192-008-0031-7](https://doi.org/10.1007/s12192-008-0031-7)
- Zhang XH, Wu H, Tang S, Li QN, Xu J, Zhang M, SuYN, Yin B, Zhao QL, Kemper N, Hartung J, Bao E-D (2017) Apoptosis in response to heat stress is positively associated with heat-shock protein 90 expression in chicken myocardial cells in vitro. *Journal of Veterinary Science* **18**, 129-140. doi: [10.4142/jvs.2017.18.2.129](https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.129)
- Zuniga MC, Raghuraman G, Zhou W (2018) Physiologic levels of resistin induce a shift from proliferation to apoptosis in macrophage and VSMC co-culture. *Surgery* **163**, 906–911. doi: [10.1016/j.surg.2017.10.051](https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.10.051)
- Zhang S, Wong EA, Gilbert ER (2015) Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. *Frontiers Bioscience* **7**, 478-490. PMID: [25961426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25961426/)
- Zhao FQ, Zhang ZW, Qu JP, Yao HD, Li M, Li S, Xu SW (2014) Cold stress induces antioxidants and Hsps in chicken immune organs. *Cell Stress and Chaperones*, **19(5)**, 635–648. doi: [10.1007/s12192-013-0489-9](https://doi.org/10.1007/s12192-013-0489-9)
- Wang Y, Chen L, Hagiwara N, Knowlton AA (2010) Regulation of heat shock protein 60 and 72 expression in the failing heart. *Journal of Molecular Cellular Cardiology* **48**, 360–366. doi: [10.1016/j.yjmcc.2009.11.009](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.11.009)
- Welch WJ (1992) Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiological reviews* **72**, 1063-1081. doi: [10.1152/physrev.1992.72.4.1063](https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.4.1063)
- Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES (2011) Curcumin: A review of anti-

cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma.

Molecular Cancer 10, 12. doi: [10.1186/1476-4598-10-12](https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-12)

VI Considerações finais

O estresse térmico promove a variação da temperatura corporal dos frangos de corte independentemente do modo de aferição, via probe ou via retal. Com o aumento da espessura da parede da artéria aorta e diminuição de seus diâmetros látero lateral e ântero posterior, além do aumento na dosagem de LOOH, na quantificação do ROS e diminuição na dosagem de NO, aumento na expressão gênica da *iNOS*, *ECA* e do *CETP*. Apresentaram piora no desempenho e maior aumento na sinalização dos genes de apoptose. Porém, a suplementação com a metionina proporcionou, de maneira independente da fonte (DL-Met e DL-MMet), melhor desempenho das aves e tornou os mecanismos de proteção cardíaca mais eficientes.