

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CONTROLE MOLECULAR DO CONSUMO VOLUNTÁRIO
DE RAÇÃO, METABOLISMO LIPÍDICO E DO SISTEMA DE
DEFESA ANTIOXIDANTE EM FRANGOS DE CORTE

Autora: Angélica de Souza Khatlab
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CONTROLE MOLECULAR DO CONSUMO VOLUNTÁRIO
DE RAÇÃO, METABOLISMO LIPÍDICO E DO SISTEMA DE
DEFESA ANTIOXIDANTE EM FRANGOS DE CORTE

Autora: Angélica de Souza Khatlab
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliane Gasparino

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2016

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

K63c	<p>Khatlab, Angélica de Souza</p> <p>Controle molecular do consumo voluntário de ração, metabólico lipídico e sistema de defesa antioxidante em frangos de corte/ . -- Maringá, 2016.</p> <p>116 f. : il. , figs. , tabs.</p> <p>Orientadora: Prof.ª. Dr.ª. Eliane Gasparino.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2016.</p> <p>1. Melhoramento genético animal. 2. Gene hipotânicos. 3. Metabolismo lipídico. 4. Estresse térmico. 5. Estresse oxidativo. 6. Metionina. I. Gasparino, /eliane, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.</p> <p>CDD 22. ED.636.0821 JLM000187</p>
------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CONTROLE MOLECULAR DO CONSUMO
VOLUNTÁRIO DE RAÇÃO, METABOLISMO LIPÍDICO
E DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE
EM FRANGOS DE CORTE**

Autora: Angélica de Souza Khatlab
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 25 de fevereiro de 2016.

Prof^ª Dr^ª Fernanda Losi
Alves de Almeida

Prof.ª Dr.ª Maria Amélia
Menck Soares

Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino
(Orientadora)

“Ainda que eu fale a língua dos homens
e dos anjos, se não tiver amor,
Serei como o bronze que soa, ou como
o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar
e conheça todos os mistérios e toda a ciência;
ainda que eu tenha tamanha fé a ponto
de transportar montanhas,
se não tiver amor nada serei.

Ainda que eu distribua todos os
meus bens entre os pobres
e ainda que entregue meu próprio
corpo para ser queimado,
se não tiver amor,
nada disso me aproveitará.”

Trecho da carta de São Paulo aos Coríntios

Aos meus pais, Aparecido de Souza Khatlab e Maria Fátima Khatlab. Que são exemplos de fé, de luta constante, de esperança e de pura sabedoria, que me ensinaram a trilhar por caminhos grandiosos. E me proporcionaram a oportunidade de estudar e que de modo sábio agarrei com fé e força. Não há palavras que expressem minha eterna gratidão.

À minha avó, Maria Alves. Um ser espetacular que mesmo com tantos problemas ainda se lembra de cuidar dos outros. Que fica imensamente feliz ao ver sua neta chegando tão longe, realizando sonhos que também são dela. Sempre levarei comigo suas palavras: - Estude porque vale à pena.

À grande professora e amiga, Eliane Gasparino. Faltam palavras para expressar tamanha gratidão e carinho. Sem ela a realização de mais esse sonho na minha vida não teria acontecido.

À querida professora e amiga, Ana Paula Del Vesco. Quisera eu traduzir em palavras o carinho que tenho por ela. O significado que ela tem na realização desse sonho.

Ao meu namorado, Teovan A. Sandes, por me incentivar a todo momento.

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - Brasil, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

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

Ao meu Deus, que me proporcionou a vida e me capacitou a chegar aqui.

Aos meus pais, por não desistirem de mim, por todo amor e confiança que depositam em mim. Hoje preciso agradecer por vocês terem investido nos meus estudos e não nos meus caprichos.

À minha avó, Maria Alves, e ao meu avô, Elisio Felix, obrigada por cada almoço, cada palavra de conforto, obrigada minha amada avó por tudo e por você existir!!!

À professora Eliane Gasparino, a eterna “prof” pelo exemplo que é. Por toda ajuda, paciência, confiança, orientação, ensinamentos preciosos e valiosos, que certamente levarei para a vida toda. Obrigada por não desistir de mim. Por me incentivar a ir cada vez mais longe.

À professora Ana Paula Del Vesco, por toda paciência, por me ensinar a todo momento, por acreditar em mim e me incentivar sempre falando que eu posso mais. Em especial agradeço por sua amizade e por fazer parte da minha vida.

Ao meu namorado, Teovan A. Sandes, pelo carinho, pelo amor, incentivo e por me fazer acreditar que sou capaz. Agradeço por você fazer parte da minha vida.

Ao professor Paulo Cesar Pozza, a quem eu tanto admiro. Obrigada por me coorientar e transmitir seus conhecimentos de maneira tão sábia.

Ao Sr. Adhemar Rodrigues de Oliveira Neto, meus sinceros agradecimentos por sua ajuda.

Às minhas eternas amigas, Analice Brigatti , Julia Gasparino, Elenice Reis e Raiane Martinelli, por estarem comigo a cada momento, me apoiando e estando sempre presentes. A amizade é um tesouro.

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

BIOGRAFIA

ANGÉLICA DE SOUZA KHATLAB, filha de Aparecido de Souza Khatlab e Maria Fátima Khatlab, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 10 de dezembro de 1987.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, no período de 2009 a 2013.

Em março de 2014, iniciou o mestrado no Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal - Melhoramento Genético Animal, sob orientação da Professora Dr^a. Eliane Gasparino.

No dia 25 de fevereiro de 2016, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.0 Desempenho das aves: Consumo de ração e Metabolismo lipídico	2
1.1 Consumo de ração: mecanismos bioquímicos e moleculares.....	2
1.2 Metabolismo lipídico.....	14
1.2.1 Lipoproteínas e apolipoproteínas.....	16
1.2.2 Biossíntese de lipídeos.....	19
1.2.3 β -oxidação de lipídeos.....	22
2.0 Desempenho das aves: Estresse térmico e Estresse oxidativo	27
2.1 Estresse térmico.....	27
2.2 Estresse oxidativo.....	28
2.3 Sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	29
LITERATURA CITADA	31
II. OBJETIVOS.....	53
III. ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES HIPOTALÂMICOS E O CONTROLE DO CONSUMO DE RAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE: EFEITOS DO SEXO E DA TEMPERATURA AMBIENTAL.....	54
RESUMO	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	57
RESULTADOS	61
DISCUSSÃO	63
LITERATURA CITADA	67
IV. EFEITOS DO SEXO E DA IDADE SOBRE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPIDICO EM FRANGOS DE CORTE.....	72
RESUMO	72
INTRODUÇÃO	73
MATERIAL E MÉTODOS	74
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	82
LITERATURA CITADA	86

V. METHIONINE IMPROVES CAPACITY OF BROILER RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS.....	90
ABSTRACT	90
INTRODUCTION	91
MATERIAL AND METHODS	92
RESULTS	97
DISCUSSION	106
REFERENCES	110
VI. CONCLUSÕES GERAIS.....	116

LISTA DE TABELAS

	Página
III. ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES HIPOTALÂMICOS E O CONTROLE DO CONSUMO DE RAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE: EFEITOS DO SEXO E DA TEMPERATURA AMBIENTAL.....	54
Tabela 1- Sequências de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR).....	60
Tabela 2- Consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) em frangos de corte machos e fêmeas de 42 dias.....	61
Tabela 3- Expressão dos genes <i>NPY</i> , <i>AMPKα-1</i> , <i>POMC</i> , <i>GHRL</i> e <i>LKB1</i> no hipotálamo de frangos de corte machos e fêmeas com 42 dias de idade.....	63
IV. EFEITOS DO SEXO E DA IDADE SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO EM FRANGOS DE CORTE.....	72
Tabela 1- Sequências de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR).....	77
Tabela 2- Consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) em frangos de corte machos e fêmeas de 21 e 42 dias de idade.....	79
Tabela 3- Expressão dos genes <i>ACC</i> , <i>FAS</i> , <i>ADIPOQ</i> e <i>LKB1</i> no fígado de frangos de corte machos e fêmeas de 21 e 42 dias de idade.....	80
V. METHIONINE IMPROVES CAPACITY OF BROILER RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS.....	90
Table 1- Experimental diets centesimal composition (expressed as-fed basis).....	94
Table 2- Primer sequences used for quantitative real-time polymerase chain reaction.....	96
Table 3- Weight gain (WG), feed intake (FI), and proportional weight of organs and cuts of broilers from the starter period.....	98
Table 4- Weight gain (WG), feed intake (FI), and proportional weight of organs and cuts of broilers from the grower period.....	99
Table 5- SOD, CTSL2, TRx, TRxR 1, and MsrA gene expression in the liver of	

broilers from the starter period.....	100
Table 6- SOD, CTSL2, TRx, TRxR 1, and MsrA gene expression in the liver of broilers from the grower period	101
Table 7- Plasma analyses of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) activity, uric acid and creatinine content of broilers from the starter period.....	103
Table 8- Plasma analyses of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) activity, uric acid and creatinine content of broilers from the grower period.....	105

LISTA DE FIGURAS

	Página
IV. EFEITO DO SEXO E DA IDADE SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO EM FRANGOS DE CORTE.....	72
Figura 1- Expressão do gene proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (AMPK α -1) no fígado de machos e fêmeas (A) e em aves de 21 e 42 dias de idade (B). Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).....	80
Figura 2- Expressão do gene apolipoproteína B (APOB) no fígado de machos e fêmeas (A) e em aves de 21 e 42 dias de idade (B). Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).....	81
Figura 3- Expressão do gene apolipoproteína A-I (APOA-I) em aves de 21 e 42 dias de idade. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).....	81
V. METHIONINE IMPROVES CAPACITY OF BROILER RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS.....	90
Figure 1- Methionine supplementation and environment effects on plasma homocysteine content of birds from the starter (A) and grower (B) period. The results are expressed as μ mol/L. The results are shown as the average, and the standard deviation is represented by the vertical bars. The different letters between the treatment groups represent a significant difference (P<0.05).....	102

RESUMO

O consumo voluntário de ração é um processo que integra o sistema nervoso central e os tecidos periféricos do organismo, sendo influenciado basicamente por fatores inerentes aos animais como o sexo, a idade, e alguns neuropeptídeos relacionados ao consumo de ração; e fatores externos, como a temperatura ambiental. Condições ambientais com altas temperaturas às quais as aves são expostas, e a maior deposição de gordura em detrimento à deposição de carne magra, são fatores que afetam o desenvolvimento dos animais. Nesse sentido, com este trabalho os nossos objetivos foram avaliar o efeito do sexo, da idade, do estresse térmico agudo e da suplementação de metionina sobre o desempenho, expressão de genes relacionados ao consumo, envolvidos no metabolismo lipídico, e genes relacionados ao sistema antioxidante em frangos. Para isto, no primeiro experimento, frangos de corte machos e fêmeas com 42 dias de idade, recebendo dieta formulada para atender as necessidades nutricionais, foram mantidos em conforto térmico ou expostos ao estresse térmico agudo (38°C por 24 horas, iniciando aos 41 dias de idade). No segundo experimento, frangos de corte machos e fêmeas, de 1-21 e 22-42 dias de idade, recebendo dietas formuladas para atender as necessidades nutricionais, foram mantidos em ambiente com temperatura de conforto térmico. No terceiro experimento, frangos de corte de 1-21 e de 22-42 dias de idade foram divididos em dois tratamentos referentes à suplementação de metionina: sem suplementação de metionina (MD) e nível recomendado de metionina (MS). Um grupo de animais foi mantido em conforto térmico e o outro grupo de animais foi exposto ao estresse térmico agudo (38°C por 24 horas, iniciando aos 20 ou aos 41 dias de idade, dependendo da fase experimental avaliada). Nestes experimentos, foram avaliados o desempenho e a expressão dos genes: neuropeptídeo Y (*NPY*), proteína quinase ativada por AMP subunidade α -1 (*AMPK α -1*), pró-ópiomelanocortina (*POMC*), grelina (*GHRL*), proteína quinase hepática B1 (*LKB1*), acetil-CoA-carboxilase (*ACC*),

ácido graxo sintase (*FAS*), adiponectina (*ADIPOQ*), apolipoproteína A-I (*APOA-I*), apolipoproteína B (*APOB*), superóxido dismutase (*SOD*), tioredoxina (*TRx*), tioredoxina redutase (*TRxRI*), metionina sulfóxido redutase A (*MsrA*), catepsina L2 (*CTSL2*), além de alguns marcadores biológicos do estresse oxidativo. No primeiro trabalho, observamos que aves em estresse térmico reduziram o consumo de ração e apresentaram perda de peso significativa. Observamos ainda que machos apresentaram maior consumo de ração do que as fêmeas. O maior valor de expressão do gene *NPY* foi observado em machos em ambiente de conforto, e o menor valor em machos submetidos ao estresse térmico. Machos submetidos ao estresse térmico apresentaram maior valor de expressão do gene *AMPK α -1*. Com relação à expressão do gene *POMC*, comparando animais que permaneceram em conforto térmico, observamos que fêmeas apresentaram maior expressão deste gene. Machos apresentaram maior nível de expressão do gene *LKB1*. Não foi observado nenhum efeito significativo sobre o gene da grelina (*GHRL*). Com relação ao metabolismo lipídico, comparando aves de 42 dias de idade, observamos que machos apresentaram maior consumo. Maior ganho de peso foi observado em machos e nos animais com 42 dias de idade. Fêmeas com 21 dias de idade apresentaram maior valor de expressão dos genes *ACC*, *LKB1* e *ADIPOQ*. Em relação ao gene *FAS*, maior nível de expressão foi observado em machos com 21 dias de idade. Maior expressão do gene *AMPK α -1* foi observada nos machos e em animais com 21 dias de idade. A respeito da expressão do gene *APOB*, observamos maior expressão em fêmeas, e em aves com 42 dias de idade. A expressão do gene *APOA-I* foi maior em animais com 21 dias de idade. No experimento em que avaliamos os efeitos da suplementação da metionina e do estresse calórico agudo, observamos que o estresse térmico aumentou a temperatura corporal e reduziu o consumo de ração e o ganho de peso dos animais, entretanto animais na fase de crescimento sob condição de conforto térmico recebendo dieta MS apresentaram maior consumo de ração. Na fase de 1-21 e de 22-42 dias observamos que aves em estresse térmico recebendo dieta MD apresentaram maior valor de atividade da alanina aminotransferase (ALT). Na fase de 1-21 dias observamos que o conteúdo de creatinina foi maior nas aves em conforto térmico recebendo dieta MD. Já o estresse térmico reduziu o conteúdo de ácido úrico, a atividade da enzima creatina quinase (CK), e aumentou a expressão do gene *SOD*. A suplementação de metionina, por sua vez, aumentou o conteúdo de ácido úrico e também a expressão do gene *SOD*. Em animais estressados pelo calor recebendo dieta MS, observamos maior valor de expressão dos genes *TRxRI* e *MsrA*. Na fase de 22-42

dias, observamos que aves expostas ao estresse térmico apresentaram maior valor de expressão dos genes *SOD*, *TRxRI* e *MrsA*. Observamos menor atividade enzimática da creatina quinase (CK), maior atividade da aspartato aminotransferase (AST), maior conteúdo de creatinina plasmática e menor conteúdo de ácido úrico em animais estressados pelo calor. Aves recebendo dieta MS apresentaram maior valor de expressão dos genes *SOD*, *TRxRI* e *MsrA*, e também menor valor de atividade da AST, maior valor de atividade da CK, e menor conteúdo de creatinina. O conteúdo de homocisteína foi menor em aves estressadas pelo calor em ambas as fases avaliadas. Nossos resultados de forma conjunta nos permitem sugerir que alguns genes hipotalâmicos podem estar envolvidos nas diferenças observadas no consumo voluntário de ração entre animais de diferentes sexos e expostos a diferentes condições ambientais, e que o controle do consumo ocorre em função do balanço entre a ação de substâncias orexígenas e anorexígenas. Ainda contribui para caracterizar alguns dos mecanismos que diferenciam machos de fêmeas, e animais de 21 de animais de 42 dias no que se refere ao metabolismo lipídico. A maior deposição de gordura geralmente observada em fêmeas e em animais mais velhos pode decorrer da maior expressão de genes relacionados à síntese de lipídeos como a *ACC*, *FAS* e *APOB*. E animais que necessitam de maior aporte energético devido à maior taxa metabólica podem lançar mão de vias relacionadas à maior oxidação lipídica através da maior expressão dos genes *LKB1*, *AMPK α -1*, e *APOA-1*. Suporta-se ainda a hipótese de que uma dieta suplementada com metionina pode atenuar os efeitos do estresse térmico sofridos pelos animais, por aumentar a capacidade antioxidante e por agir em via metabólica que promove o crescimento dos frangos.

Palavras-chave: genes hipotalâmicos, metabolismo lipídico, estresse térmico, estresse oxidativo, metionina

ABSTRACT

Voluntary feed intake is a process that integrates the central nervous system and peripheral tissues, being influenced primarily by factors inherent to animals such as sex, age, and some neuropeptides; and external factors, such as the ambient temperature. Environmental conditions with high temperatures that birds are exposed to, and the greater fat deposition compared to lean meat, are factors that affect the development of animals. In this sense, by this work our main objective was to evaluate the effect of sex, age, acute heat stress and methionine supplementation on the performance, gene expression related to feed intake, involved in lipid metabolism, and antioxidant system related genes in broilers. For that, in the first experiment male and female broiler with 42 days of age, receiving diet formulated to meet the nutritional needs, were kept in thermal comfort or exposed to acute heat stress (38° C for 24 hours starting at 41 days of age). In the second experiment male and female broiler, 1-21 and 22-42 days of age, fed diets formulated to meet the nutritional needs were kept in an environment with a temperature of thermal comfort. In the third experiment broilers of 1-21 and 22-42 days of age were divided into two treatments regarding to methionine requirement: without any methionine supplementation (MD) and recommended level of methionine (MS). One group of animals was kept under thermal comfort and another group of animals were exposed to heat stress (38°C for 24 hours starting at 20 or at 41 days of age, depending on the assessed experimental phase). In these experiments, we evaluated performance, the gene expression of: neuropeptide Y (*NPY*), AMP-activated protein kinase subunit α -1 (*AMPK α -1*), pro-opiomelanocortin (*POMC*), ghrelin (*GHRL*), liver kinase B1 (*LKB1*), acetyl-CoA carboxylase (*ACC*), fatty acid synthase (*FAS*), adiponectin (*ADIPOQ*), apolipoprotein A-I (*APOA-I*), apolipoprotein B (*APOB*), superoxide dismutase (*SOD*), thioredoxin (*TRx*), thioredoxin reductase (*TRxRI*), methionine sulfoxide reductase A (*MsrA*), cathepsin L2 (*CTSL2*), besides a few

biological markers of oxidative stress. In the first work, we observed that birds under heat stress environment decreased its feed intake and showed significant weight loss. We still observed that males had higher feed intake than females. The greatest value of *NPY* gene expression was observed in males under thermal comfort, and the smallest value in males under thermal stress. Males under thermal stress had higher value of *AMPK α -1* gene expression. Regarding the expression of the *POMC* gene, comparing animals that remained in thermal comfort, we found that females had higher expression of this gene. Males had higher expression of *LKB1* gene. There were no significant effect on ghrelin gene (*GHRL*). With respect to the lipid metabolism of 42-day-old broilers, males had higher feed intake. Greater weight gain was observed in males and in animals with 42-day-old. 21-day-old females had higher value of *ACC*, *LKB1* and *ADIPOQ* expression. Considering *FAS* gene, higher level of expression was observed in males with 21 days of age. Greater *AMPK α -1* expression was observed in males and in birds with 21 days of age. Regarding to the *APOB* expression, we observed higher values for females, and in birds with 42 days of age. The *APOA-1* expression was higher at 21 days of age. In the experiment that we have evaluated the effects of supplementation and acute heat stress, we observed that high temperatures increased body temperature and reduced feed intake and weight gain of broilers, however animals on stage of growth under thermal comfort fed MS diet had higher feed intake. For the periods of 1 to 21 and 22 to 42 days we observed that birds in heat stress fed MD diet showed higher activity value for alanine aminotransferase (ALT). In the phase 1-21 days we observed that the creatinine content was higher in birds under thermal comfort and in birds fed MD diet. But thermal stress reduced the content of uric acid, the activity of creatine kinase (CK), and increased the SOD expression. Methionine supplementation increased the content of uric acid and the SOD expression. Broiler kept under heat stress fed MS diet, showed higher *TRxRI* and *MsrA* genes expression. At phase 22-42 days of age we observed that birds under heat stress had higher expression values of *SOD*, *TRxRI* and *MrsA* genes. We observed lower enzymatic activity of creatine kinase (CK), while aspartate aminotransferase (AST) activity was increased, as well as plasma creatinine, but uric acid values were smaller in birds under heat stress. Birds fed MS diet had higher value of *SOD*, *TRxRI* and *MsrA* genes expression, lower values of AST activity, greater value of CK activity, and lower creatinine content. The homocysteine content was lower in heat stress birds in both phases. Our results jointly enable us to suggest that some hypothalamic genes may be involved in the observed differences in voluntary feed

intake between animals of different sexes and exposed to different environmental conditions, and the control of intake is a function of the balance between orexigenic and anorectic action. Also contributes to characterize some of the mechanisms that differentiate males from females, and animals at 21 days old from animals at 42 days old in relation to lipid metabolism. The higher fat deposition usually observed in females and in older animals may result from increased expression of genes related to the synthesis of lipids such as *ACC*, *FAS* and *APOB*. And animals that need more energy intake due to the increased metabolic rate may resort pathways related to increased lipid oxidation through increased expression of *LKB1* gene, *AMPK α -1* and *APOA-I*. It also supports the hypothesis that a diet supplemented with methionine can attenuate the effects of thermal stress suffered by the animals to increase the antioxidant capacity and act on metabolic pathways that promote the growth of chickens.

Keywords: hypothalamic genes, lipid metabolism, thermal stress, oxidative stress, methionine

I. INTRODUÇÃO

Os grandes avanços tecnológicos empregados no setor avícola durante as últimas décadas têm colocado esse segmento em condição de produção privilegiada, permitindo a obtenção de produtos finais de melhor qualidade e com menor tempo de produção. Segundo Garcia (2004), isso se deve não somente a mudanças tecnológicas, mas também à reestruturação das indústrias avícolas, melhorias empregadas na nutrição, no manejo, a implantação de empresas integradoras, e ao fato do Brasil apresentar alto nível de produção de milho e soja, que são os principais ingredientes que compõem as rações dos frangos.

Além dos fatores citados acima, o melhoramento genético das aves é um dos maiores responsáveis por tais mudanças, pois os frangos são obtidos de linhagens selecionadas, de modo intensivo, para crescimento mais rápido, melhor eficiência alimentar e maior rendimento de carne entre outras características (Deeb e Lamont, 2002; Havenstein et al., 2003). Destaca-se ainda que ganhos genéticos adicionais possam ser obtidos através do uso de técnicas moleculares, já que a genética molecular tem permitido melhor compreensão de como determinados genes atuam na determinação de características de interesse econômico (Naqvi, 2007; Zhu e Zhao, 2007).

Aliadas a tais fatores, as melhorias no ambiente de produção que amenizam oscilações drásticas de temperatura também têm contribuído de maneira positiva para a produção (Jones et al., 2005; Furlan, 2006). O desenvolvimento do animal depende de mecanismos fisiológicos complexos, que agem de forma integrada, proporcionando o crescimento animal, e que por sua vez é limitado pela taxa de nutrientes disponíveis no organismo. O consumo de alimento é um processo que integra o sistema nervoso central e os tecidos periféricos do organismo (Richards et al., 2010), e que sofre influências das características inerentes aos animais, como o sexo, a idade (Bertechini, 2012), os

neuropeptídios hipotalâmicos orexígenos e anorexígenos (Kawakami et al., 2000; Zhou et al., 2005) e alguns hormônios como a insulina e o glucagon (Denbow, 1994; Woods et al., 2006); e das condições externas, como a disponibilidade e qualidade da água, o teor de energia e proteína na ração, e a temperatura ambiental (Mbajorgu et al., 2011).

Dessa forma, pode-se perceber que o desempenho das aves é função de muitos fatores, que devem ocorrer de maneira totalmente integrada e coordenada para máxima eficiência produtiva. Mudanças externas podem levar os animais a desenvolverem diversos distúrbios metabólicos, sendo cada vez mais importante a compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos do animal. Embora diversas pesquisas tenham sido realizadas para melhor entender como variáveis relacionadas aos animais e ao ambiente podem influenciar a expressão de genes que governam as mais diversas rotas metabólicas, esses processos ainda não são totalmente conhecidos.

Sendo assim, este trabalho visa explorar os possíveis efeitos do sexo, da idade, do estresse térmico agudo e da suplementação de metionina, sobre o desempenho, expressão de genes relacionados ao consumo, envolvidos no metabolismo lipídico e genes relacionados ao sistema antioxidante em frangos.

1. Desempenho das aves: Consumo de ração e Metabolismo lipídico

1.1. Consumo de ração: mecanismos bioquímicos e moleculares

A produção avícola tem sido alvo de intensas pesquisas, nas mais diversas áreas que abrangem a produção, com o intuito de aperfeiçoar cada vez mais esse setor. Nesse sentido, o melhoramento genético tem grande contribuição nos índices produtivos alcançados (Scheuermann et al., 2003). Também deve-se ressaltar que as condições ambientais às quais as aves são expostas têm passado por constantes melhorias (Tirawattanawanich et al., 2011), proporcionando assim condição de bem-estar animal (Horne e Achterbosch, 2008). Além desses fatores, a nutrição rigorosamente balanceada e controlada, é outro ponto chave que permitiu a expansão desse mercado (Nunes et al., 2000; Stringhini et al., 2006).

Já que o objetivo constante da produção animal é o máximo desempenho, a nutrição das aves é baseada na oferta de rações formuladas criteriosamente para atender às necessidades nutricionais de manutenção, crescimento, produção e reprodução, de

acordo com cada fase de criação dos frangos (Warren e Emmert, 2000; Pope e Emmert, 2002; Buteri et al., 2009). Embora o intenso melhoramento genético animal tenha proporcionado a vantagem de produzir frangos de corte com uma melhor taxa de crescimento, maior capacidade de consumo de ração diário, e que alcancem o peso de abate em menor tempo de produção, muitos problemas a nível fisiológico e metabólico têm acompanhado os animais como, por exemplo, a maior taxa de deposição de gordura (Gaya et al., 2006), que pode se tornar um problema para os produtores caso o manejo de ração não seja corretamente realizado durante toda a fase de produção (Richards et al., 2010).

O controle do consumo voluntário de ração pelos animais envolve uma série de mecanismos complexos, que relaciona o sistema nervoso central com os tecidos periféricos do organismo (Richards et al., 2010), que pode ser influenciado por diversos fatores, como os nutrientes que compõem a dieta, o *status* energético e nutricional do animal, as necessidades metabólicas, agentes estressores, entre outros (Ferket e Gernat, 2006). Na literatura, encontramos pelo menos cinco teorias aceitas envolvidas na regulação do consumo das aves (Fox et al., 1987), como a teoria glicostática, lipostática, aminostática, termostática e a distensão do trato gastrointestinal (Vieira, 2010). A teoria glicostática é embasada nos níveis de glicose sanguínea, disponível no organismo para processos metabólicos, após os processos de digestão e absorção. Essa teoria relaciona o aumento do consumo de ração em função de baixos níveis de glicose plasmática (Chaput e Tremblay, 2009). Na condição de hipoglicemia, ocorre aumento na secreção do hormônio glucagon pelas células α do pâncreas (Quesada et al., 2008), que estimula a produção de glicose no fígado, através de processos metabólicos denominados glicogenólise (degradação do glicogênio hepático) e/ou gliconeogênese (síntese de glicose através de precursores que não são carboidratos como, por exemplo, aminoácidos glicogênicos, glicerol e lactato) (Mayes, 1994). Já, em condição de hiperglicemia, ocorre aumento na secreção de insulina pelas células β do pâncreas (Fu et al., 2013), ocasionando entre outros efeitos a redução no consumo de alimento (Vanderweele, 1994).

O hormônio insulina atua no cérebro, particularmente no hipotálamo por meio de seus receptores, promovendo a inibição do consumo, sendo este mecanismo provavelmente mediado por um aumento na expressão do gene pró-ópiomelanocortina (POMC) (Benoit et al., 2002; Stockhorst et al., 2004). De acordo com Honda et al. (2007), a administração intracerebroventricular de insulina em frangos é capaz de

suprimir o consumo de ração; os autores sugerem que esta resposta pode ser devido ao estímulo da insulina, sobre a expressão de genes como a pró-ópiomelanocortina (POMC), fator liberador de corticotropina (CRH) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), substâncias consideradas anorexígenas.

A teoria lipostática (Kennedy, 1953) se refere às reservas energéticas do animal oriunda dos adipócitos, e segundo essa teoria, quando as reservas energéticas se encontram elevadas, o hormônio leptina secretado pelo tecido adiposo estimula neurônios anorexígenos presentes no hipotálamo (Cowley et al., 2001), que induzem a redução do consumo pelo animal. Segundo a teoria aminostática, dietas com composição de aminoácidos desbalanceados (falta ou excesso) levarão a uma redução no consumo de ração (Park, 2006). Essa redução no consumo parece ser mediada pelo sistema nervoso central, que contém uma área sensível à mudança na concentração plasmática do aminoácido limitante na ração (Gonzales, 2002). De acordo com Gietzen (1993), a região do cérebro denominada de córtex pré-piriforme detecta a menor concentração do aminoácido, o que promove redução no consumo de ração. Esse mesmo autor cita ainda que este efeito pode estar associado com alteração na concentração de neurotransmissores e na síntese proteica, sendo possivelmente o mecanismo envolvido na regulação do consumo mediado pelo neurotransmissor norepinefrina e por 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC).

A distensão do trato gastrointestinal, que ocorre em virtude da presença do bolo alimentar em seu interior, refere-se à teoria que supõe que a distensão do papo, da moela, sendo que segmentos do intestino delgado das aves levariam as mesmas a reduzirem o consumo (Ferket e Gernat, 2006). Esses órgãos contêm terminações nervosas que, ao perceberem a distensão, emitem sinais ao centro da saciedade presente no sistema nervoso central, reduzindo então o consumo de ração (Cummings e Overduin, 2007).

A teoria termostática está relacionada à termorregulação dos animais; diversos estudos têm demonstrado que um dos principais fatores ambientais que afetam o consumo de ração é a temperatura (Cheng et al., 1997; Sands e Smith, 1999; Quinteiro-Filho et al., 2010). A faixa de temperatura denominada de conforto térmico refere-se à temperatura ambiente na qual as aves são capazes de manter a homeostase da temperatura corporal interna (Furlan e Macari, 2002). Nessa faixa de temperatura a energia líquida será utilizada pelo animal com maior eficiência para a produção (Furlan, 2006). Nesse sentido, quando a temperatura ambiente se encontra acima da zona de

conforto térmico, as aves reduzem o consumo de ração na tentativa de minimizar produção de calor adicional, em função do calor gerado durante o metabolismo (Ferket e Gernat, 2006).

Por outro lado, em ambiente com temperaturas abaixo da zona de conforto térmico, as aves podem aumentar o consumo de ração (Alves, 2012). A redução ou o aumento do consumo acontece como uma resposta do animal, na tentativa de equilibrar a disponibilidade de calor gerado pelo metabolismo animal, para assim manter a homeotermia. Independentemente do mecanismo (termogênese ou termólise) pelo qual o animal tenta ajustar os processos fisiológicos para manter a temperatura corporal adequada, ambos os processos se tornam indesejáveis, uma vez que mais energia será desviada para manutenção do animal e menor energia estará disponível para produção (Lara e Rostagno, 2013).

Além da temperatura ambiental, aves de diferentes sexos também podem apresentar diferenças no consumo de ração e conseqüentemente no desempenho. Tem sido observado que os machos apresentam maior consumo de ração do que as fêmeas (Silva, 2013). Essas diferenças podem ser atribuídas a algumas diferenças fisiológicas entre os sexos, como a maior taxa metabólica basal (Mitchell et al., 1927), maior taxa de crescimento e maior deposição de proteína do macho em relação às fêmeas (Bertechini, 2012). E segundo Bertechini (2012) a taxa de crescimento mais rápida observada em machos pode estar associada ao maior consumo observado nesses animais, que por sua vez está intimamente relacionada com as diferentes necessidades nutricionais entre os sexos (Shalev e Pasternak, 1998). Entretanto, frangos de corte machos, selecionados para crescimento mais rápido, podem ser mais afetados quando expostos a ambiente com alta temperatura do que fêmeas, e a eficiência alimentar das fêmeas em função da sua menor necessidade de energia, quando comparada aos machos, se torna favorável nessa condição (Cahaner e Leenstra, 1992).

Durante os períodos pré-prandial e pós-prandial, os sinais hormonais (colecistocinina, insulina, glucagon, grelina, entre outros) oriundos dos tecidos periféricos do organismo e sinais não hormonais derivados a partir dos nutrientes (glicose, aminoácidos e ácidos graxos livres) são conduzidos até o hipotálamo, que então reconhece e interpreta os sinais gerando respostas adequadas de estímulo ou inibição do consumo. O hipotálamo é composto pela área lateral (LHA), e por vários núcleos; núcleo arqueado (ARC), dorsomedial (DMH), paraventricular (PVN), e

ventromedial (VMH), que compõem o domínio funcional das diversas áreas hipotalâmicas (Minor et al., 2009).

O estímulo da área hipotalâmica lateral (LHA), considerado o centro da fome, faz com que o animal consuma ração; lesões nessa área podem levar à inibição do consumo (Anand e Brobeck, 1951; Stanley et al., 2005). Por outro lado, a estimulação do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) leva o animal a cessar o consumo, já que produz a sensação de saciedade, sendo então este núcleo denominado como centro da saciedade; lesão no VMH pode ocasionar hiperfagia e obesidade nos animais (Rozkowska e Fonberg, 1971; Coll et al., 2007).

O núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo contém células neuronais responsáveis pela síntese e liberação de neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeo Y - NPY e proteína relacionada ao agouti - AgRP) e neuropeptídeos anorexígenos (pró-opiomelanocortina - POMC e transcrito regulado pela cocaína e amfetamina - CART) (Minor et al., 2009). Os tecidos periféricos, como o estômago, intestino, fígado, pâncreas e tecido adiposo, estão estreitamente relacionados à fome, à saciedade e à condição energética do organismo, pois os mesmos emitem sinais hormonais (grelina, colecistocinina, leptina, insulina, peptídeo YY, entre outros) (Murphy e Bloom, 2004), capazes de estimular ou inibir o consumo. Sinais não hormonais oriundos de nutrientes como a glicose, ácidos graxos livres e aminoácidos (Lee et al., 2005) também estão envolvidos nesse processo. Esses sinais, através do nervo vago, chegam ao núcleo do trato solitário (NTS) e em seguida no hipotálamo, por meio de inervações emitidas do NTS para o hipotálamo (Ahima e Antwis, 2008).

No hipotálamo ocorre a integração dos sinais para determinar respostas adequadas de consumo de alimento e homeostase energética (Neary et al., 2004; Simpson et al., 2009). As substâncias provenientes dos tecidos periféricos atravessam a barreira hematoencefálica (Chaudhri et al., 2008) do núcleo hipotalâmico, se ligando a receptores presentes nos neurônios orexígenos e/ou anorexígenos no núcleo arqueado hipotalâmico (Cheung et al., 1997; Varela e Horvath, 2012) denominados de neurônios de primeira ordem (Rijke et al., 2005). A interação entre receptor e hormônio promove a liberação de neuropeptídeos orexígenos e/ou anorexígenos que agem sobre neurônios orexígenos de segunda ordem presentes no núcleo hipotalâmico paraventricular e dorsomedial, na área hipotalâmica lateral, e em outras regiões que contém hormônio concentrador de melanina (MCH) ou orexina (Sartin et al., 2010). Ou ainda agem sobre neurônios anorexígenos de segunda ordem, que contém o fator liberador de

corticotropina (CRH) (McMinn et al., 2000) e hormônio liberador de tireotrofina (TRH) localizados em parte no núcleo paraventricular (Crespo et al., 2014) para alterar o consumo, de acordo com as necessidades fisiológicas dos animais. Essa integração entre os tecidos periféricos com as vias neuronais hipotalâmicas é influenciada por diversos fatores; além dos fatores supracitados, o jejum e algumas doenças também podem influenciar o comportamento alimentar e dessa maneira alterar o desenvolvimento animal (Zhou et al., 2005; Sartin et al., 2011).

O neuropeptídeo Y (NPY) é um polipeptídeo com 36 resíduos de aminoácidos, e apresenta alto grau de homologia com o peptídeo YY (PYY) (Tatemoto, 1982). O PYY é um hormônio secretado pelas células intestinais na presença de bolo alimentar em seu interior (Zhou et al., 2006), sendo considerado um anorexígeno, uma vez que o mesmo atua via receptor de NPY Y2 (Y2-R) inibindo a liberação do NPY e ativando neurônios contendo pró-ópiomelanocortina (POMC) no núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico, causando uma redução no consumo de alimentos (Chelikani et al., 2005; Ito et al., 2006). O NPY é amplamente expresso no sistema nervoso central (Eva et al., 2006), estando presente nos vários núcleos que compõem o hipotálamo, sendo que as maiores concentrações encontram-se no núcleo arqueado e núcleo paraventricular do hipotálamo (Chronwall et al., 1985). Algumas funções fisiológicas como o controle da temperatura corporal (Felies et al., 2004) e homeostasia cardiovascular (Zukowska-Grojec e Vaz, 1988), têm sido atribuídas ao NPY. Outra importante função atribuída a esse neuropeptídeo diz respeito ao estímulo do consumo de alimento, que ocorre quando o neuropeptídeo Y se liga ao receptor Y1 (Kanatani et al., 2000). Segundo Kask et al. (1998), além do receptor Y1, o receptor Y5 também pode estar envolvido na regulação do consumo. Esses receptores são expressos em diversas regiões do sistema nervoso central, particularmente no hipotálamo (Hu et al., 1996; Nichol et al., 1999; Kopp et al., 2002).

Estudos mostram que aves, assim como mamíferos, também apresentam aumento no consumo de ração quando o NPY é injetado intracerebroventricularmente (Kuenzel et al., 1987). Dessa forma, o NPY tem sido considerado como o mais potente peptídeo orexígeno (Kinzler e Edwards, 2009). A expressão do NPY pode ser influenciada pelo jejum, realimentação após jejum (Mizuno et al., 1999; Zhou et al., 2005), por substâncias endócrinas, como a leptina (Jang et al., 2000) e a insulina (Sato et al., 2005), assim como pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Richards et al., 2010). Ainda de acordo com Boswell et al. (1999), a restrição alimentar ou privação de

alimentos promove aumento nos níveis de mRNA do NPY no núcleo arqueado do hipotálamo.

Além dos fatores supracitados, Ito et al. (2015) observaram em seu estudo que o estresse por calor também pode influenciar a expressão do mRNA do NPY. Esses autores observaram que frangos estressados por calor e com consequente redução no consumo apresentaram maiores níveis de expressão do mRNA do NPY. A proteína relacionada ao agouti (AgRP) (Illynska e Argyropoulos, 2008) é expressa pelas mesmas células neuronais que o NPY, exercendo também estímulo positivo sobre o consumo (Broberger et al., 1998), e ainda age como uma proteína antagonista dos receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R/MC4R), que exercem efeitos anorexígenos (Fu e Pol, 2008).

O gene pró-ópiomelanocortina (POMC) codifica um pré-pró-hormônio de 31-36 kDa, que sofre clivagem após a sua tradução (MacNeil et al., 2002), pela ação de enzimas pró-hormônio convertase (1 e 2) (Slominski et al., 2000). O processamento do POMC ocorre de forma específica em determinado tecido corporal, podendo dar origem a hormônios peptídicos bioativos, entre os quais o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), hormônio estimulante de melanócitos (MSH α , β e γ), β -endorfina, entre outros hormônios (Schauer et al., 1994; MacNeil et al., 2002). Essas substâncias agem através de cinco receptores da melanocortina (MC1R - MC5R) (Stanley et al., 2005), encontrados em diferentes regiões do organismo (Vergoni e Bertolini, 2000), controlando importantes funções. Em aves, os receptores de melanocortina (CMC1-CMC5) apresentam homologia aos receptores de mamíferos (Takeuchi et al., 1996; Takeuchi e Takahashi 1998; Takeuchi et al., 1998).

Os receptores MC3R e MC4R são abundantemente expressos no sistema nervoso central, realizando importante função sobre o consumo e o balanço de energia (MacNeil et al., 2002). As substâncias derivadas do POMC, ao se ligarem em seus respectivos receptores, exercem diversas funções. Entre elas destaca-se que quando o α -hormônio estimulante de melanocortina (α -MSH) se liga no receptor de melanocortina 3 e/ou 4 ocorre a inibição do consumo de alimentos e o aumento do gasto de energia corporal (Strader et al., 2003). Devido às substâncias derivadas do pró-ópiomelanocortina como o α -MSH (Olszewski et al., 2001) desempenharem funções na redução do consumo, o mesmo é considerado como um peptídeo anorexígeno (Varela e Horvath, 2012). Esse efeito exercido pelo α -MSH pode ser inibido pelo antagonista do MC4R, a AgRP (Yang et al., 2003).

O efeito anorexígeno do POMC também pode ser observado em frangos, já que Tachibana et al. (2001) observaram em seu estudo realizado com frangos neonatais que a administração intracerebroventricular do α -MSH suprime o consumo de ração. Também foi observado que em frangos de corte fêmea a injeção intravenosa do peptídeo sintético melanotan-II (MTII), um análogo do α -MSH, causa redução no consumo de ração (Hen et al., 2006). O gene POMC é encontrado sendo expresso em diversos tecidos como a pele, sistema imunológico e o sistema nervoso central (principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo) (Bicknell, 2008). Quando o organismo animal dispõe de quantidades excedentes de energia, ocorre aumento na expressão do POMC e redução na expressão da AgRP, no intuito de inibir o consumo (Hagan et al., 1999; Varela e Horvath, 2012). A expressão do POMC também pode ser regulada por hormônios, como a leptina e a insulina (Belgardt e Bruning, 2010), secretados pelo tecido adiposo e pelo pâncreas, respectivamente.

Esses hormônios agem por meio de receptores (receptor para leptina - LepR e insulina - InsR) encontrados nos neurônios presentes no núcleo arqueado do hipotálamo (Varela e Horvath, 2012). Quando a leptina e a insulina se ligam a seus respectivos receptores, as mesmas promovem aumento na expressão do POMC, que além de promover a inibição do consumo, promoverá a homeostase da glicose sanguínea (Varela e Horvath, 2012), na tentativa de restaurar e manter o balanço energético adequado. Estudos sugerem ainda que a exposição do animal ao estresse aumenta a expressão dos genes POMC e receptor de melanocortina 4 (MC4R) (Yamano et al., 2004; Kheirabad et al., 2015).

A grelina é outro hormônio que tem sido relacionado ao consumo de alimentos (Shintani et al., 2001). O gene grelina (GHRL) codifica uma pré-progrelina, que pode ser subsequentemente convertida em três formas conhecidas como a grelina acilada que contém uma modificação acil, grelina des-acil (forma não acilada), e obestatina (Yin et al., 2009; Delhanty et al., 2012). Para que essa substância possa se ligar em seu receptor e exercer sua função biológica, a mesma é acilada no resíduo serina, na posição 3, principalmente com o ácido *n*-octanoico (Kojima e Kangawa, 2005, Yin et al., 2009). Em frangos, a grelina também sofre modificação pela adição do ácido *n*-octanoico ou *n*-decanoico (Kaiya et al., 2002).

A grelina é encontrada em vários tecidos corporais (Kojima e Kangawa, 2005), e o maior nível de grelina tem sido detectado no estômago de mamíferos (Date et al., 2000; Ariyasu et al., 2001); e no proventrículo de aves (Richards et al., 2006; Buyse et al.,

2009). No sistema nervoso central, a grelina tem sido encontrada na hipófise (Korbonits et al., 2000) e no hipotálamo (Cowley et al., 2003; Ferrini et al., 2009).

Essa distribuição da grelina em várias partes do organismo sugere que a grelina pode desempenhar efeito endócrino, agindo sobre células distantes do seu local de produção; efeito autócrino, função sobre a célula que a produziu; e/ou efeito parácrino, ação sobre as células vizinhas (Chen et al., 2007). Segundo Kojima e Kangawa (2005), a grelina secretada pelo tecido periférico pode atravessar a barreira hematoencefálica do hipotálamo, e por via indireta ativar regiões do hipotálamo relacionadas ao consumo.

O hormônio grelina em mamíferos é considerado uma substância orexígena (Wren et al., 2000; Wren et al., 2001), e nessa espécie animal a liberação da grelina é influenciada pelo estado nutricional do animal, como o jejum (Cummings et al., 2001) e o nível de hipoglicemia (Yin et al., 2009), que promovem o aumento na liberação da grelina. O hormônio grelina acilado também foi identificado no proventrículo, duodeno e cérebro de frangos (Kaya et al., 2002). Uma de suas principais funções observada em aves está relacionada ao aumento na liberação do hormônio do crescimento (GH) pela hipófise (Takaya et al., 2000), quando ocorre a ligação da grelina ao seu receptor secretagogo de GH (GHS-R), encontrado em maior concentração na hipófise e no hipotálamo (Ahmed e Harvey, 2002; Geelissen et al., 2003).

Kaiya et al. (2002) sugerem possível função da grelina na regulação da função da glândula adrenal em aves, sugerindo efeito mais pronunciado na liberação de corticosterona, do que na liberação do GH. Pois, de acordo com esses mesmos autores, a administração de grelina em frangos causa aumento no nível de GH e corticosterona plasmática. Estudos realizados com frangos neonatais, com administração intracerebroventricular de grelina, têm demonstrado função oposta desse hormônio em relação aos mamíferos, uma vez que em aves é observada ação inibitória da grelina sobre a ingestão de ração (Furuse et al., 2001; Saito et al., 2005). Ocloñ e Pietras (2011) observaram também que a injeção intraperitoneal de grelina induz anorexia em frangos com sete dias de idade. Ao contrário dos mamíferos, nos quais a atividade da grelina é mediada pela ativação de substâncias orexígenas, o efeito anorexígeno da grelina em aves parece ser mediado pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) (Saito et al., 2005). Já que estudos têm demonstrado que a grelina pode estimular a liberação do hormônio liberador de corticotropina, que ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultando em aumento no nível de corticosterona plasmática (Saito et al., 2005; Ocloñ e Pietras, 2011). O fator liberador de corticotropina influencia respostas

comportamentais, frente a situações estressoras, causando entre outros efeitos fisiológicos a inibição do consumo (Furuse et al., 1997). Song et al. (2012), avaliando galinhas poedeiras encontraram maior nível de expressão do gene grelina no hipotálamo e no proventrículo de aves submetidas ao estresse por calor. Por outro lado, Lei et al. (2013) não observaram mudanças na expressão do gene grelina no hipotálamo de frangos de corte machos expostos ao estresse por calor, porém no proventrículo foi observado o mesmo efeito encontrado por Song et al. (2012).

Assim como os mecanismos relacionados acima, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também apresenta estreita relação com o controle do consumo de ração. Segundo Lei e Lixian (2012), a AMPK é amplamente expressa no cérebro, incluindo as regiões que exercem controle sobre o consumo. O mecanismo pelo qual esse processo ocorre pode ser explicado, em parte, por alteração na expressão de neuropeptídeos orexígenos (Minokoshi et al., 2008), e anorexígenos (Minokoshi et al., 2004) nos neurônios presentes no hipotálamo, e por sinalização derivada dos nutrientes bem como sinalização hormonal (Xue e Kahn, 2006). A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), é um complexo enzimático heterotrimérico, composto por uma subunidade catalítica com duas isoformas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e duas subunidades regulatórias (isoformas $\beta 1$, $\beta 2$; e isoformas $\gamma 1, \gamma 2$ e $\gamma 3$) (Hardie et al., 2003). Esse complexo enzimático tem sido bastante estudado e caracterizado em função da sua ação sobre a homeostase energética no organismo animal (Kahn et al., 2005; Richards e Proszkowiec-Weglarz, 2007), e em virtude da sua ação hipotalâmica sobre processos relacionados ao consumo de alimento (Xue e Kahn, 2006; Ropelle et al., 2007). A AMPK é ativada quando os níveis de energia fisiológicos (ATP) estão abaixo do normal, e ocorre um aumento na relação AMP:ATP (Towler e Hardie, 2007).

Após a ativação desse complexo enzimático pela depleção dos níveis de ATP, o mesmo age inibindo as rotas anabólicas que consomem ATP, por exemplo, a via de síntese de proteínas e lipídeos; e ativando rotas catabólicas capazes de produzir ATP, como a degradação dos carboidratos e oxidação de lipídeos. Essas ações que tem por objetivo atingir o equilíbrio energético ocorrem através da fosforilação da AMPK por meio de enzimas metabólicas (Hawley et al., 2002; Ronnett et al., 2009). Embora o mecanismo exato pelo qual a AMPK é ativada não seja totalmente conhecido, estudos mostram que independente do mecanismo de ativação, o passo principal é a fosforilação do resíduo de treonina 172, presente na subunidade catalítica α (Stein et al., 2000; Kahn et al., 2005; Ronnett e Aja, 2008).

Durante esse mecanismo de ativação, a AMP se liga a subunidade γ , provocando uma mudança conformacional no complexo AMPK, e alostericamente ativa a subunidade α (Crute et al., 1998, Ronnett e Aja, 2008). A AMP, além de auxiliar no mecanismo de fosforilação da AMPK, protege a mesma da desfosforilação e inativação realizada pela proteína fosfatase do tipo 2A_C (Davies et al., 1995). A fosforilação e consequente ativação da AMPK pode ocorrer por meio de diversas enzimas, entre elas a proteína quinase- β dependente de Ca⁺²/calmodulina (CaMKK β) (Carling et al., 2008), e a proteína quinase hepática B1 (LKB1), considerada a principal proteína de ativação da AMPK (Woods et al., 2003; Shaw et al., 2004). A proteína LKB1, também conhecida como serina/treonina quinase 11 (STK 11), é um complexo heterotrimérico com duas proteínas acessórias, a pseudoquinase STRAD (proteína adaptadora relacionada à Ste-20) (isoformas α ou β) e a proteína scaffold MO25 (isoformas α ou β) (Boudeau et al., 2003), a formação desse complexo pode regular a atividade quinase e a estabilidade da LKB1 (Gan e Li, 2014). A proteína MO25 tem sido caracterizada como um componente, que permite a estabilização da associação entre LKB1 e a STRAD no citosol celular, assim como melhora na atividade catalítica da LKB1 (Boudeau et al., 2003). Essas três unidades juntas formam uma unidade biológica que fosforila e ativa a AMPK (Woods et al., 2003). Esse complexo pode ainda ativar pelo menos outras 12 quinases pertencentes à família de quinases relacionadas à AMPK (Lizcano et al., 2004).

Em aves, Proszkowiec-Weglarz et al. (2006) detectaram AMPK na sua forma ativa em núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação do consumo de alimentos e balanço energético. Esses autores sugerem que assim como em mamíferos, as aves também apresentam uma via funcional LKB1/AMPK. A ativação da AMPK pode ocorrer em função do estresse metabólico e ambiental, que pode inibir a síntese de ATP ou acelerar a utilização do ATP, causando assim um aumento na relação celular de AMP:ATP (Hardie, 2007; Richards et al., 2010). O estresse celular pode ser desencadeado, entre outros fatores, pelo baixo nível de glicose sanguínea, hipóxia, choque térmico (Kahn et al., 2005) e estresse oxidativo (Ronnett e Aja, 2008). O exercício físico ou a contração muscular vigorosa (Hayashi et al., 1998) também pode influenciar a ativação da AMPK, pois essas ações necessitam de ATP para serem realizadas.

Como resposta fisiológica de defesa do organismo, a AMPK é ativada para restaurar os níveis de ATP, através da sua estimulação sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos. Hormônios como a leptina, adiponectina e insulina podem

influenciar a ativação da AMPK (Minokoshi et al., 2004). No hipotálamo complexo, a AMPK atua sobre processos relacionados ao consumo de alimento (Xue e Kahn, 2006; Ropelle et al., 2007), através da integração de sinais nutricionais e hormonais.

Essa ação se dá em função da ativação da AMPK por fatores como o jejum, que aumenta a atividade da AMPK no hipotálamo, enquanto a realimentação do animal suprime a ação enzimática da AMPK (Minokoshi et al., 2004; Minokoshi et al., 2008). Essa resposta é reflexo das mudanças que ocorrem no nível de glicose e insulina, durante o jejum e a realimentação. Minokoshi et al. (2004) observaram em seu estudo que a atividade da AMPK no núcleo arqueado e paraventricular hipotalâmico foi inibida pelo hormônio leptina, enquanto o hormônio insulina, o alto nível de glicose e a realimentação inibiram a atividade da AMPK em outras regiões do hipotálamo. Esses autores sugerem que a ação da leptina pode ser mediada pelo menos em parte no núcleo paraventricular do hipotálamo, pelo receptor de melanocortina 4, uma potente substância anorexígena (Fu e Pol, 2008). Kim et al. (2004) observaram que a administração intracerebroventricular de ácido α -lipóico, um cofator de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, reduz a atividade da AMPK hipotalâmica, e o consumo de alimentos, enquanto a administração de 2-deoxiglicose, substância que reduz o nível de ATP nas células, aumenta a atividade hipotalâmica da AMPK e o consumo.

O complexo enzimático AMPK também exerce controle sobre a atividade da enzima acetil-CoA-carboxilase (ACC) (Mihaylova e Shaw, 2012), que a partir da acetil-CoA produz malonil-CoA durante a biossíntese de ácidos graxos (Abu-Elheiga et al., 2000). O que a AMPK faz é fosforilar e inativar a ACC, enquanto o ácido α -lipoico ativa essa enzima por diminuir a fosforilação da mesma no hipotálamo, o que foi consistente com o efeito observado de redução da atividade da AMPK no hipotálamo por esse metabólito (Kim et al., 2004). O malonil-CoA nos neurônios hipotalâmicos pode ser um dos responsáveis, pelo menor consumo de alimentos, que ocorre com administração do ácido α -lipoico (Kim et al., 2004). A enzima carnitina-palmitoiltransferase-I (CPT-I) é responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial para sofrerem o processo de β -oxidação (Stephens et al., 2007). E a ativação hipotalâmica da AMPK tem sido associada à ativação da enzima CPT-I, causando redução nos níveis de ácidos graxos de cadeia longa nas células e, portanto, aumentando o consumo (Andersson et al., 2004).

Isso ocorre porque o núcleo arqueado hipotalâmico responderia aumentando a expressão de NPY e AgRP (Folmes e Lopaschuk, 2007). A atividade da CPT-I pode ser

inibida pelo malonil-CoA (Kahn et al., 2005), aumentando assim o nível de ácidos graxos no citosol. A inibição hipotalâmica da CPT-I tem sido relacionada à redução no consumo de alimentos, e há sugestão na literatura de que determinadas áreas do hipotálamo podem detectar maior nível de energia orgânica em função do maior nível de ácidos graxos, regulando dessa maneira o consumo de alimentos (Folmes e Lopaschuk, 2007). Segundo Kim et al. (2004), a atividade hipotalâmica da AMPK pode regular o consumo de alimentos e a homeostase energética, por agir como uma via sinalizadora para o hipotálamo, informando o estado energético do organismo, através das concentrações fisiológicas de malonil-CoA e ou/ ácidos graxos de cadeia longa.

1.2. Metabolismo lipídico

Atualmente, os frangos de corte são considerados como produtos do melhoramento genético, que teve como alguns dos seus objetivos a obtenção de um produto final com maior rendimento de carne magra em menor tempo de produção (Zerehdaran et al., 2004). Isso provocou algumas alterações no organismo dos animais, tornando-os mais exigentes no que se refere à alimentação (Skomorucha et al., 2009). Embora o intenso melhoramento genético animal tenha proporcionado benefícios para a produção de frangos de corte, diversos problemas a nível fisiológico e metabólico têm acompanhado os animais. Como, por exemplo, a maior taxa de deposição de gordura na carcaça (Gaya et al., 2006).

Após o consumo de ração pelos animais, no interior do trato gastrointestinal ocorre uma série de modificações sobre o alimento que foi ingerido. Através de ações físicas (motilidade do estômago e intestino delgado) e químicas, ocorre a liberação dos nutrientes contidos nos ingredientes da dieta para absorção (Guyton e Hall, 2006). Esses nutrientes, após serem absorvidos pelo organismo, irão proporcionar disponibilidade de energia para processos vitais como a manutenção, produção e reprodução. Os lipídeos que compõem a ração, estando principalmente na forma de triacilglicerol (Baião e Lara, 2005), são digeridos e absorvidos no intestino delgado, e após absorção podem seguir vários destinos metabólicos (Bertechini, 2012). Quando os produtos da digestão, contendo a fração gordurosa, alcançam o intestino delgado ocorre a secreção do hormônio colecistocinina (CCK) pela mucosa do intestino (Grider, 1994).

A CCK estimula a contração da vesícula biliar, para que ocorra a liberação de bile, e também estimula o pâncreas a secretar enzimas como a lipase e a proteína colipase, responsáveis pela hidrólise dos triacilgliceróis (Guyton e Hall, 2006). Ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima hidrolase dos ésteres de colesterol (Harvey e Ferrier, 2012), e os fosfolipídeos são degradados pela enzima fosfolipase A₂ (Burke e Dennis, 2009). A secreção de bile pela vesícula biliar, para o interior do intestino delgado, se constitui em um processo importante da digestão de lipídeos (Danielsson, 1963; Moghimipour et al., 2015), pois a mesma promoverá a emulsificação das moléculas lipídicas, aumentando assim a área de superfície dos lipídeos que serão hidrolisados, posteriormente pela ação da enzima lipase pancreática auxiliada pela proteína colipase.

Em aves jovens, os processos de digestão, absorção e consequente utilização dos lipídeos pelo organismo são ineficientes, provavelmente em função da menor taxa de produção da enzima lipase pelo pâncreas (Al-Marzooqi e Lesson, 1999). A secreção e a atividade de enzimas pancreáticas, incluindo a lipase, aumentam de 20 a 100 vezes entre o período de eclosão das aves, até por volta de 21 dias de idade (Kermanshahi, 1998). A menor recirculação e menor taxa de síntese de ácido biliar, segundo Serafin e Nesheim (1970), pode também ser uma das causas que levam a uma menor utilização de gorduras por aves jovens. Pois estudos têm demonstrado que a adição de emulsificantes exógenos em dietas contendo níveis adequados de gordura para frangos jovens melhora a utilização das fontes lipídicas (Al-marzooqi e Lesson, 1999; Roy et al., 2010; Neto et al., 2011).

Subsequente à digestão, os produtos derivados da ação da lipase como os ácidos graxos de cadeia curta e os monoglicerídeos serão absorvidos de maneira passiva pelos enterócitos e daí para a corrente sanguínea por serem mais hidrossolúveis (Furlan e Macari, 2002), enquanto os ácidos graxos de cadeia longa, diglicerídeos, éster de colesterol e vitaminas lipossolúveis necessitam ser solubilizados formando micelas mistas, que facilitará a passagem dos lipídeos do meio aquoso do intestino para o interior dos enterócitos (Nelson e Cox, 2011). Os sais biliares presentes nas micelas serão então liberados e reabsorvidos no jejuno e íleo (Krogdahl, 1985).

Nos enterócitos, ocorre o processo de reesterificação dos ácidos graxos, formando novamente triacilglicerol, que se une a apolipoproteínas, colesterol livre e esterificado, e a fosfolipídeos para formar quilomícrons (lipoproteínas), que serão transportados pelo sistema linfático, seguindo para a corrente sanguínea (Gerber, 2002). Em aves, o

sistema linfático é pouco desenvolvido (Cherian et al., 1996), e após a reesterificação formam-se estruturas denominadas portomicrons, que segundo Griffin et al. (1982) é semelhante em tamanho e composição de triacilglicerol ao quilomicron formado em mamíferos. Os portomicrons são secretados diretamente no sistema porta hepático (Krogdahl 1985; Chesworth et al., 1998). A partir da corrente sanguínea, os quilomicrons, e portomicrons no caso das aves, serão então transportados para os tecidos corporais, como o músculo, tecido adiposo (Harvey e Ferrier, 2012) e particularmente o fígado (Bertechini, 2012).

Enquanto os quilomicrons/portomicrons circulam pela corrente sanguínea, os mesmos vão sendo metabolizados pela ação enzimática da lipase lipoproteica presente nos vasos sanguíneos (Goldberg et al., 2009), que age hidrolisando os triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas em ácidos graxos e glicerol. A ativação da enzima lipase lipoproteica se dá pela presença de apolipoproteína C-II (Goldberg, 1990). Adicionalmente, o catabolismo da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) pela lipase lipoproteica também fornecerá ácidos graxos e glicerol (Hermier, 1997). Os ácidos graxos gerados durante a hidrólise enzimática das lipoproteínas serão absorvidos por diferentes tecidos corporais, podendo ser utilizados para obtenção de energia a partir da oxidação dos ácidos graxos e, ainda, serem armazenados sob a forma de triacilglicerol no tecido adiposo (Nelson e Cox, 2011). Por outro lado, o glicerol será metabolizado no fígado produzindo glicerol-3-fosfato, que pode ser utilizado tanto no processo de glicólise como no processo de gliconeogênese (Harvey e Ferrier, 2012).

1.2.1. Lipoproteínas e apolipoproteínas

As lipoproteínas são partículas cuja função é o transporte de lipídeos do meio aquoso, como a corrente sanguínea, para os órgãos, em virtude da insolubilidade dos lipídeos nesse meio (Gerber, 2002). Essas partículas são compostas por um centro contendo triacilgliceróis e ésteres de colesterol, envolvidas por uma membrana de fosfolipídeos; e associados à membrana encontram-se colesterol livre e proteínas denominadas de apolipoproteínas (Ginsberg, 1998). No plasma sanguíneo, várias formas de lipoproteínas podem ser encontradas, como quilomicrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (Guyton

e Hall, 2006). A diferença entre elas se encontra em sua composição lipídica, conteúdo de apolipoproteínas e a função que cada uma delas desempenha (Nelson e Cox, 2011).

Diversas apolipoproteínas são encontradas no organismo, sendo as mais comuns denominadas como apolipoproteína A encontrada sob as formas apoA-I, apoA-II e apoA-IV, apolipoproteína B (apoB-48 e apoB-100), apolipoproteína C (apoC-I, apoC-II, apoC-III) e apolipoproteína E (Mahley et al., 1984). As apolipoproteínas podem estar associadas às lipoproteínas de forma integral (apolipoproteína B), as quais não podem ser removidas (Sato et al., 2005), ou de forma periférica que podem ser transferidas de uma lipoproteína para outra, como as apoA-I, apoC-I, C-II, C-III e apoE (Mayes, 1994). As apolipoproteínas, de acordo com Ginsberg (2002), desempenham importante função na regulação do metabolismo de lipoproteínas e, ainda, exercem funções como estabilizadoras da estrutura lipoproteica (Forti e Diament, 2007), ativação e/ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (Donma e Donma, 1989), cofator enzimático (Castellani e Lusic, 2001) e promoção da interação das lipoproteínas com receptores celulares (Zaiou et al., 2000).

A apolipoproteína A-I (apoA-I) é a principal constituinte da fração proteica da lipoproteína de alta densidade (HDL) (Fielding e Fielding, 1995), considerada uma importante substância antiaterogênica (Forti e Diament, 2006). Em aves, essa proteína além da HDL também compõe grande parte da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (Hermier, 1997). A pró-apolipoproteína A-I é sintetizada no intestino delgado e fígado, e subsequentemente é transportada para a corrente sanguínea, sendo em seguida clivada por protease plasmática, gerando uma proteína madura denominada apolipoproteína A-I (Zannis et al., 1983; Fielding e Fielding, 1995). No plasma sanguíneo, a apoA-I presente nos quilomicrons e na VLDL é transferida para as partículas lipoproteicas HDL. Em associação com a HDL, a apoA-I promove o processo de efluxo do colesterol, das células periféricas extra-hepáticas para o fígado, onde é metabolizado (Spady, 1999). Segundo Wang et al. (2000), a apoA-I pode agir como um ligante para o transportador que promove o fluxo de colesterol livre das células (cassete ABCA-I). O colesterol sintetizado nos tecidos extra-hepáticos, ou obtido das lipoproteínas, é um substrato para a ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), presente na HDL (Steyrer et al., 1994; Leança et al., 2010). A LCAT é ativada pela apoA-I, sendo essa apolipoproteína caracterizada como cofator para LCAT (Parks et al., 1995). Essa enzima catalisa a reação de esterificação do colesterol livre na lipoproteína HDL (Kunnen e Eck, 2012).

Maiores níveis de HDL no plasma têm sido associados com a maior capacidade de proteger o organismo, contra a formação de placas aterogênicas, principalmente por realizar vital papel no transporte reverso do colesterol (Leança et al., 2010). Em frangos com baixa eficiência alimentar, Zhuo et al. (2015) sugerem que a regulação negativa da expressão do gene APOA-I pode afetar a formação da HDL, prejudicando desse modo o processo de transporte reverso de colesterol, a partir do tecido adiposo para o fígado. Esses autores sugerem ainda que a menor expressão do gene APOA-I pode resultar em maior acúmulo de gordura abdominal.

A apolipoproteína B é encontrada sob duas formas, apoB-100 e apoB-48 (Cladaras et al., 1986). É uma proteína estrutural, necessária para a síntese e secreção de quilomicrons e VLDL (Ginsberg, 2002). A apoB desempenha, entre outras funções, um importante papel na absorção e secreção de lipídeos, incluindo o colesterol e triglicerídeos (Cruz et al., 2015). A apoB-100 é sintetizada no fígado e faz parte da composição dos quilomicrons, da VLDL, IDL e LDL (Forti e Diament, 2007). Essa apolipoproteína contém domínios ligantes, que interagem com receptores celulares para partículas de LDL, sendo essencial para que ocorra a entrada de LDL nas células (Innerarity et al., 1990). A LDL assume importância clínica por estar envolvida no desenvolvimento da aterosclerose (Carmena et al., 2004). A apoB-48 é uma importante proteína presente nos quilomicrons, e a mesma é sintetizada no intestino delgado em função da fração gordurosa presente na dieta. Essa apolipoproteína (apoB-48) é formada como resultado de um códon de parada prematuro no códon 2153 da apoB-100 (Davidson e Shelness, 2000), representando aproximadamente 48% do peso molecular da apoB-100 (Chen et al., 1987).

As funções desempenhadas pela apoB supracitadas podem ter efeito sobre a deposição de tecido adiposo e o crescimento corporal dos animais, sendo considerado como um possível gene candidato no estudo da deposição de gordura em frangos (Zhang et al., 2006), já que estudos confirmam que o gene APOB apresenta relação com a deposição de gordura (Zhang et al., 2006). Segundo Couillard et al. (2002), o acúmulo de gordura abdominal está associado com uma maior concentração de partículas lipoproteicas contendo apoB-48 e apoB-100. Outras apolipoproteínas encontradas no organismo, como a apolipoproteína C-II (apoC-II), atua ativando a enzima lipase lipoproteica (Olivecrona e Beisiegel, 1997), enquanto a apoC-III inibe a atividade dessa enzima (Wang et al., 1985). A apoE presente no quilomicron remanescente permite que

o mesmo seja captado pelo fígado, por meio de uma interação entre os remanescentes de quilomicrons e os receptores celulares (Kowal et al., 1989).

1.2.2. Biossíntese de lipídeos

O processo de biossíntese de ácidos graxos, e subsequentemente de triacilglicerol, ocorre no citoplasma das células do tecido adiposo e do fígado, em resposta a dietas ricas em energia (carboidratos) (Yin et al., 2000; Kersten, 2001). A deposição de gordura (triacilglicerol) na carcaça ocorre também em função da disponibilidade de substratos lipídicos, oriundos da lipogênese no fígado transportados pela VLDL (Hermier, 1997). Em aves, a síntese de lipídeos ocorre em sua maior parte no fígado (Musa e Chen, 2007; Bertechini, 2012).

O processo de biossíntese de lipídeos inicia-se com a formação de malonil-CoA, a partir da acetil-CoA e de bicarbonato (HCO_3^-), em uma reação irreversível catalisada pela enzima acetil-CoA-carboxilase (Nelson e Cox, 2011). Essa enzima contém biotina em sua estrutura, e é caracterizada como um complexo enzimático multifuncional, por conter três regiões distintas denominadas de proteína carreadora de biotina, biotina-carboxilase e a transcarboxilase (Wakil et al., 1983). A reação que forma o malonil-CoA ocorre em duas etapas; na primeira etapa a biotina-carboxilase transfere o grupo carboxil oriundo do bicarbonato (HCO_3^-) para a biotina formando biotinila, na dependência de ATP; na segunda etapa, a transcarboxilase transfere o grupo carboxil (CO_2) da biotinila para a acetil-CoA, formando malonil-CoA (Berg et al., 2012).

A síntese de lipídeos continua em uma sequência de reações repetitivas, ocorrendo em quatro etapas, que alonga a cadeia de ácido graxo em dois átomos de carbono, mediadas pela ação do sistema multienzimático ácido graxo sintase (FAS) (Harvey e Ferrier, 2012). Esse complexo multienzimático consiste de homodímeros polipeptídicos idênticos, que apresenta sete domínios catalíticos que atuam de maneira distinta, sendo eles: malonil/acetil-CoA-ACP-transferase (MAT), β -cetoacil-ACP-sintase (KS) que contém um resíduo de cisteína com um grupo tiol, β -cetoacil-redutase (KR), β -hidroxiacil-ACP-desidratase (DH), enoil-ACP-redutase (ER), tioesterase (TE) e a proteína transportadora de grupos acila (ACP), a qual contém um grupamento tiol oriundo da 4'-fosfopanteteína que mantém o complexo unido (Brink et al., 2002).

O processo de alongação da cadeia de ácido graxo inicia-se com os grupamentos acila e malonila, obtidos da acetil-CoA e malonil-CoA respectivamente, sendo

transferidos para sítios tióis específicos na FAS, por meio de uma reação catalisada pelo domínio malonil/acetil-CoA-ACP-transferase (Smith, 1994). O grupamento acetil é transferido para o grupamento tiol do resíduo de cisteína da β -cetoacil-ACP-sintase, e o grupo malonila é transferido para o grupamento tiol da ACP (Garret e Grisham, 2010).

Na etapa seguinte, os substratos acetil e malonila ativados, são condensados em uma reação catalisada pelo domínio β -cetoacil-ACP-sintase, formando acetoacetil-ACP; nesta reação o grupo malonila é descarboxilado liberando átomos de carbono na forma de CO_2 (Olsen et al., 2001). Posteriormente, a acetoacetil-ACP será reduzida pela β -cetoacil-ACP-redutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), que doa elétrons formando D- β -hidroxibutiril-ACP, que é então desidratado pela β -hidroxiacil-ACP-desidratase, formando trans- Δ^2 -butenoil-ACP que contém dupla ligação (Lai e Cronan, 2004). Na última etapa do ciclo de elongação da síntese de ácidos graxos, o trans- Δ^2 -butenoil-ACP será reduzido, ou seja, saturado pela enzima enoil-ACP-redutase em uma reação na qual o NADPH ou nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) doa elétrons, formando assim butiril-ACP que é um ácido graxo com quatro átomos de carbono (Massengo-Tiassé e Cronan, 2009).

O grupo butirila presente no grupo tiol da fosfopanteteína da ACP é transferido para o grupo tiol da β -cetoacil-ACP-sintase, que atua como grupo acetil no próximo ciclo de alongamento da cadeia de ácidos graxos (Nelson e Cox, 2011). O próximo ciclo tem início com outro grupo malonila, ligando-se ao grupo tiol da fosfopanteteína da ACP e condensando-se com o grupo butirila, com perda de CO_2 (Garret e Grisham, 2010). O produto dessa reação, o β -cetoacil-ACP, que contém seis átomos de carbono, será reduzido, desidratado e reduzido novamente como no ciclo anterior, porém agora será produzido um grupo acila saturado, com seis átomos de carbono. Após sete ciclos envolvendo os processos de condensação e redução, será formado o palmitato que contém 16 carbonos saturados que ainda está ligado a ACP (Harvey e Ferrier, 2012). Nesse ponto, o alongamento da cadeia de ácido graxo é interrompido, e o palmitato é liberado da ACP por meio da atividade hidrolítica do domínio tioesterase da FAS (Ohlrogge e Jaworski, 1997). O palmitato é precursor de outros ácidos graxos saturados como o estearato (18 carbonos) (Oosterveer et al., 2009). Ainda por meio da enzima acil graxo-CoA-dessaturase presente no retículo endoplasmático, em uma reação de dessaturação, o palmitato e estearato são os precursores dos ácidos graxos monoinsaturados como o palmitoleato 16:1(Δ^9) e oleato 18:1(Δ^9) (Paton e Ntambi,

2009). A partir desse ponto, o organismo não é capaz de introduzir dupla ligação adicional, e desse modo não sintetizam outros ácidos graxos insaturados, sendo considerados essenciais ao organismo.

A enzima acetil-CoA-carboxilase tem importante papel no controle da síntese de lipídeos, e a mesma pode ser inibida pelo hormônio glucagon e epinefrina, presentes em condição de jejum (Berg et al., 2012). A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também inativa essa enzima por meio de fosforilação, quando os níveis de energia orgânica estão baixos (Hawley et al., 2002). Por outro lado, o hormônio insulina secretado após alimentação ativa a ACC (Witters et al., 1988). Outra substância que ativa a ACC é o citrato, que apresenta maior nível quando acetil-CoA e ATP estão disponíveis no organismo (Kim et al., 1989; Nelson e Cox, 2011).

A biossíntese de lipídeos em frangos machos e fêmeas apresentam algumas diferenças, sendo a maior taxa de deposição de gordura encontrada em fêmeas (Silva, 2012; Fouad e El-Senousey, 2014). Essa diferença entre os sexos pode ocorrer em função de diversos fatores que ainda não são totalmente conhecidos, porém há sugestões de que a diferença metabólica e o impacto hormonal seriam alguns dos fatores responsáveis por tais diferenças (Tumová e Teimouri, 2010). Segundo Tor et al. (2002), frangos machos castrados e não castrados avaliados na mesma idade de abate e peso corporal apresentaram diferenças na deposição de gordura; sendo que os machos castrados tiveram maior conteúdo de gordura abdominal, intermuscular e subcutânea. Esses efeitos podem ser em virtude da redução na concentração plasmática do hormônio testosterona (Chen et al., 2005), bem como pela menor atividade da hipófise em secretar o hormônio do crescimento (GH) que tem efeito antilipogênico (Tor et al., 2002).

Além do sexo, a idade é outro fator que está relacionado à deposição de gordura na carcaça, e tem sido observado que frangos mais velhos apresentam maior conteúdo de gordura na carcaça em relação às aves mais novas (Zerehdaran et al., 2005; Nikolova et al., 2007; Silva, 2012). Isto pode ser devido ao fato de que, durante o desenvolvimento corporal dos frangos, o tecido adiposo cresce em função de fases sucessivas de aumento no número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) dos adipócitos (Tumová e Teimouri, 2010), sendo observado que o processo de hipertrofia dos adipócitos se torna predominante em frangos a partir de sete semanas de idade (Pfaff e Austic, 1976; Mourot e Hermier, 2001). Na fase hipertrófica, o maior acúmulo de gordura pode estar relacionado com aumento dos níveis de mRNA da lipase lipoprotéica (LPL) que catalisa a reação de hidrólise do triacilglicerol (Sato et al., 2008). E de acordo com Sato et al.

(1999), a inibição da atividade da LPL poderia atuar de maneira benéfica reduzindo o acúmulo de gordura corporal em frangos. Além da LPL, o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- γ (PPAR γ) também desempenha importante função na regulação de deposição de gordura, e estudo mostra que o nível de expressão do mRNA do PPAR γ tende a aumentar com a idade dos frangos (Sato et al., 2004).

1.2.3. β -oxidação de lipídeos

Quando o organismo se encontra em déficit energético, diversas reações metabólicas ocorrem a fim de disponibilizar energia para o organismo animal. Uma das reações metabólicas ativas é a β -oxidação de lipídeos, que ocorre na matriz mitocondrial (Poirier et al., 2006). Antes que os ácidos graxos sejam oxidados e para que eles possam reagir com as enzimas responsáveis pela sua oxidação, os mesmos devem ser convertidos em um intermediário ativo, em uma reação dependente de ATP (Berg et al., 2012). Nessa etapa da reação, o grupo carboxil do ácido graxo será combinado com o grupo tiol da coenzima A (CoA), na presença da enzima acil-CoA-sintetase, que está localizada na membrana externa da mitocôndria e ATP (Weimar et al., 2002). Gerando como produto o acil graxo-CoA, AMP e pirofosfato (PP_i), esse PP_i será hidrolisado por meio da enzima pirofosfatase, que libera energia adicional assegurando que a ativação dos ácidos graxos seja completa (Watkinsa e Ellis, 2012).

Os acil graxos-CoA formados nessa reação de ativação poderão ser transportados para o interior da matriz mitocondrial para serem oxidados com consequente produção de ATP. Os ácidos graxos de cadeias mais curtas podem ser ativados e oxidados no interior da matriz mitocondrial independente da carnitina, enquanto os ácidos graxos de cadeias longas não podem penetrar na membrana mitocondrial (Garret e Grisham, 2010), e por isso os acil graxos-CoA a serem oxidados devem estar ligados ao grupo hidroxil da carnitina, formando acil-graxo-carnitina. A transferência desse ácido graxo para dentro da matriz mitocondrial é catalisada pela enzima carnitina-palmitoiltransferase I (CPT-I), presente na membrana externa da mitocôndria (Sharma e Black, 2009).

O acil-graxo-carnitina entra na matriz mitocondrial por meio do transportador acil-carnitina/carnitina translocase, da membrana mitocondrial interna (Berg et al., 2012). O grupo acil graxo será transferido da carnitina para a coenzima A (CoA) intramitocondrial, através da ação da carnitina-palmitoiltransferase II (CPT-II), que está

localizada na membrana interna das mitocôndrias (Garret e Grisham, 2010). Essa enzima após a reação promove a liberação do acil-graxo-CoA e da carnitina dentro da matriz mitocondrial, sendo que a carnitina retornará para o espaço intermembrana através do transportador acil-carnitina/carnitina translocase (Harvey e Ferrier, 2012).

O acil-graxo-CoA sofrerá desidrogenação por meio da acil-CoA-desidrogenase, que tem como grupo prostético a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), produzindo trans- Δ^2 -enoil-CoA, um produto que contém dupla ligação (Ghisla e Thorpe, 2004). Os elétrons aqui formados são transferidos para a FAD, que se reduz e doa seus elétrons a flavoproteína de transferência de elétrons, presente na cadeia respiratória mitocondrial. Esses elétrons dentro da cadeia respiratória passarão para o oxigênio (O_2) produzindo nessa reação ATP. A β -oxidação continua com uma molécula de água sendo adicionada a dupla ligação do trans- Δ^2 -enoil-CoA, formando L- β -hidroxiacil-CoA, na reação catalisada pela enzima enoil-CoA-hidratase (Poirier et al., 2006).

O produto formado no passo anterior é desidrogenado pela enzima β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase formando β -cetoacil-CoA, nessa reação nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada (NAD^+) é o aceptor de elétrons (Garret e Grisham, 2010). A NADH doa seus elétrons para a NADH-desidrogenase presente na cadeia respiratória, e à medida que os elétrons passam para o O_2 , mais ATP é produzido. A enzima acil-CoA-acetiltransferase (tiolase) catalisa a reação do β -cetoacil-CoA com a CoA livre que gera o acetil-CoA (Eaton et al., 1996). Nesta reação também é gerado acil-graxo-CoA encurtado em dois átomos de carbono (Berg et al., 2012). Essas reações que compõem a β -oxidação dos ácidos graxos serão repetidas sucessivamente, até que o ácido graxo seja totalmente convertido a acetil-CoA. Ácidos graxos com número ímpar de carbono, ao sofrerem o processo de β -oxidação, além de acetil-CoA formam também propionil-CoA (Harvey e Ferrier, 2012). A completa oxidação dos ácidos graxos ocorre quando as moléculas de acetil-CoA, formadas no processo de β -oxidação, serão oxidadas a CO_2 e água no ciclo do ácido cítrico (Mayes, 1994).

O transporte de elétrons gerados durante as reações, ao longo da cadeia respiratória a partir da $FADH_2$ e da NAD, permitirá a síntese de energia na forma de ATP. Ácidos graxos insaturados são oxidados de modo semelhante ao processo supracitado, porém necessitam de duas enzimas adicionais no processo denominadas de cis- Δ^3 -enoil-CoA-isomerase, e 2,4-dienoil-CoA-redutase dependente de NADPH (Miinalainen et al., 2000). Embora a via da β -oxidação seja o principal meio de oxidação dos ácidos graxos, outras vias especializadas como a α e ω oxidação podem ser utilizadas (Sanders et al.,

2006; Wanders e Komen, 2007). Essas vias catalisam a oxidação de ácidos graxos ramificados como o ácido fitânico e também ácidos graxos com dez ou doze átomos de carbono, respectivamente (Nelson e Cox, 2011; Harvey e Ferrier, 2012). Os peroxissomos também estão equipados com enzimas, capazes de oxidar os ácidos graxos de cadeia muito longa e ramificada a acetil-CoA (Singh et al., 1992). A oxidação nessa organela envolve a desidrogenação, adição de água a dupla ligação, oxidação da β -hidroxiacil-CoA a uma cetona, e clivagem tiolítica pela CoA (Garret e Grisham, 2010). Essas reações levarão à formação de acetil-CoA e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que será clivado pela enzima catalase em água e oxigênio. Além disso, a energia liberada no primeiro passo oxidativo será dissipada na forma de calor (Wanders et al., 2001; Nelson e Cox, 2011).

A oxidação de lipídeos é regulada com a finalidade de ser ativada somente quando realmente o organismo necessitar de energia. A oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria pode ser inibida por meio do malonil-CoA, formada no início da síntese de lipídeos, pois o mesmo inibe a enzima carnitina-palmitoiltransferase I, o que inviabiliza a entrada de ácidos graxos para o interior da mitocôndria (Rasmussen et al., 2002). Esse mecanismo inibe a via de degradação enquanto a síntese de lipídeos estiver ocorrendo (Hillgartner et al., 1996). Por outro lado, o hormônio adiponectina secretado pelo tecido adiposo estimula a β -oxidação dos lipídeos por meio da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Yoon et al., 2006).

A adiponectina é um hormônio proteico, expresso em sua maior parte pelo tecido adiposo, porém também tem sido encontrada sendo expressa no fígado, hipófise anterior, diencéfalo, músculo esquelético e ovário (Maddineni et al., 2005). Esse hormônio exerce várias funções no organismo, entre elas influencia de maneira positiva a via de oxidação dos lipídeos e a redução na concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo (Fruebis et al., 2001; Tomas et al., 2002). Esse hormônio é encontrado sob duas formas principais, a forma íntegra (full-length) que está presente sob três formas: um trímero de baixo peso molecular (LMW), um hexâmero de médio peso molecular (MMW) e um multímero de alto peso molecular (HMW) (Tsao et al., 2002); e a forma fragmentada denominada de adiponectina globular, gerada durante clivagem proteolítica (Santos, 2008).

De acordo com Hendricks et al. (2009), em aves, a forma predominante no plasma sanguíneo e nos tecidos é o multímero de alto peso molecular. Segundo Sintubin et al. (2011), em frangos a expressão do gene adiponectina é maior em fêmeas do que em

machos, e essa diferença observada parece ser em função de hormônios sexuais, como o estrogênio e a testosterona (Nishizawa et al., 2002; Xu et al., 2005). Os níveis plasmáticos de adiponectina em frangos também parecem ser influenciados pela idade (Cruz et al., 2015). Hendricks et al. (2009) demonstraram em seu estudo que frangos com oito semanas de idade apresentaram menor nível de adiponectina plasmática, do que frangos com quatro semanas de idade. Os mesmos citam que além da idade e do aumento no conteúdo de gordura abdominal, a rápida taxa de crescimento dos frangos podem ter ocasionado declínio nos níveis de adiponectina circulante.

A ação da adiponectina se dá por meio de dois receptores específicos denominados de receptores adipoR1 e adipoR2 (Yamauchi et al. 2003). O receptor 1 (adipoR1) é encontrado no músculo, e segundo Santos (2008) esse receptor apresenta afinidade pela adiponectina na forma globular. Enquanto o receptor 2 (adipoR2) é encontrado no fígado (Yamauchi et al., 2003), apresentando afinidade por ambas as formas da adiponectina (Yamauchi et al., 2003; Santos, 2008). Para que a ação da adiponectina ocorra, a mesma se liga ao domínio carboxi-terminal do seu receptor (extracelular), enquanto o domínio amino-terminal do receptor (intracelular) interage com a APPL 1 (*adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain and leucine zipper motif*), que é uma proteína adaptadora contendo um domínio homólogo a plecstrina (Pires, 2009).

Os efeitos da ligação da adiponectina aos seus receptores não são totalmente compreendidos, entretanto estudos têm demonstrado que a interação entre adiponectina e receptor, auxilia na fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Yamauchi et al., 2003), que consequentemente fosforila e inativa a enzima acetil-CoA-carboxilase. Ainda exerce influência sobre a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR α) (You et al., 2005; Kadowaki et al., 2006), que regula a expressão de genes relacionados à oxidação de lipídeos como a acil-CoA-graxo de cadeia longa sintetase (Wang et al., 2009). A interação entre adiponectina e receptor resulta também na ativação da proteína quinase p 38 ativada por mitógeno (p38 MAPK), que é outro possível mediador da oxidação de ácidos graxos estimulada pela adiponectina (Yamauchi et al., 2003; Xin et al., 2011).

Esses efeitos resultam na ativação do processo de oxidação dos ácidos graxos; na inibição da expressão do fator de transcrição proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP1c), que resulta na inibição da expressão genes

envolvidos no processo de lipogênese (Wang et al., 2009), como a acetil-CoA-carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) que regulam a síntese de lipídeos.

No fígado, a ativação do complexo multienzimático proteína quinase ativada por AMP (AMPK), em função de situações que causam redução no nível de ATP celular, desempenha um importante papel sobre diversas cascatas celulares, resultando em redução no processo de lipogênese e aumento na oxidação de lipídeos (Winder e Hardie, 1999). Permite-se, dessa forma, que a produção de energia (ATP) prevaleça sobre o gasto. Essa ativação pode ocorrer em função da fosforilação do resíduo de treonina 172, presente na subunidade catalítica α da AMPK (Hawley et al., 2003). A ativação da AMPK pode ocorrer por meio de duas vias, uma dependente de AMP e a outra de cálcio, sendo mediadas pelas enzimas quinase fígado B1 (LKB1) e proteína quinase β dependente de Ca^{+2} /calmodulina (CAMKK β) respectivamente (Carling et al., 2008). A proteína quinase hepática B1 (LKB1) é caracterizada como um complexo heterotrimérico, e para realizar sua ação a mesma deve estar ligada à proteína scaffold MO25 (isoformas α ou β), e a pseudoquinase STRAD (proteína adaptadora relacionada à Ste-20) (isoformas α ou β) (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003; Carling et al., 2008). Esse complexo enzimático é considerado como a principal via de ativação da AMPK, uma vez que sua deleção no fígado resultou na redução da fosforilação da AMPK (Shaw et al., 2005). Um aumento na relação celular AMP:ATP, promove a fosforilação do resíduo de treonina 172 na subunidade catalítica α da AMPK pela LKB1 (Carling et al., 2008). A adenosina monofosfato (AMP) ao se ligar na AMPK, segundo Davies et al. (1995), promove um aumento na velocidade catalítica da enzima, e protege a AMPK da desfosforilação e inativação, realizada pela proteína fosfatase do tipo 2A_C.

A AMPK é reconhecida como uma importante enzima capaz de regular o metabolismo lipídico, em virtude da sua ação sobre enzimas lipogênicas (Zhou et al., 2001). Quando a AMPK é ativada, a mesma fosforila e inativa a enzima acetil-CoA-carboxilase (ACC) (Hardie e Carling, 1997), responsável pelo processo inicial de síntese de lipídeos. A inativação da ACC no fígado pela AMPK resulta em menor síntese de malonil-CoA (Zhou et al., 2001), que é um potente inibidor da enzima carnitina-palmitoiltransferase I (CPT-I) (McGarry et al., 1977), que permite a entrada de ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial para sofrerem a β -oxidação (Berg et al., 2012). Consequentemente, esse mecanismo de inativação da ACC resulta em maior oxidação de ácidos graxos. Outro efeito observado com a ativação da AMPK no fígado,

é a redução da expressão do mRNA da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), que é um fator de transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico como a ácido graxo sintase (FAS) (Zhou et al., 2001).

2. Desempenho das aves: Estresse térmico e Estresse oxidativo

2.1. Estresse térmico

O bem estar animal se refere a fatores que proporcionem qualidade de vida para os animais no ambiente ao qual serão expostos (Meluzzi e Sirri, 2008). Um dos fatores que mais tem recebido atenção nesse sentido de proporcionar meios adequados de produção é a temperatura ambiental somada à umidade relativa do ar (Lin et al., 2005; Noiva et al., 2014). Embora muitos avanços tenham sido realizados e contribuído para melhorias nesse setor, ainda assim muitos problemas na produção são encontrados em função de temperaturas incompatíveis com a manutenção e produção dos animais (Lara e Rostagno, 2013).

Em casos onde a temperatura ambiental se encontra acima ou abaixo da zona de conforto térmico dos animais, as aves dispõem de mecanismos capazes de controlar sua temperatura corporal através do sistema fisiológico que age integrando o sistema nervoso central e os tecidos periféricos. Assim, quando a temperatura interna do corpo aumenta, as aves usam de mecanismos posturais expondo maior área superficial corporal para troca de calor (Borges et al., 2003). A maior frequência respiratória observada nas aves é um dos mecanismos de dissipação de calor interno mais importantes, porém quanto maior for essa frequência respiratória mais calor será produzido no organismo em função da contração da musculatura e isso pode gerar um quadro de hipertermia (Furlan, 2006). Em relação à baixa temperatura corporal, os mecanismos acionados são para conservação de calor. Independente se para perda ou produção de calor, os mecanismos desencadeados para a regulação da temperatura corpórea são prejudiciais do ponto de vista nutricional e produtivo, pois a energia que seria utilizada para produção, será desviada para manutenção causando pior desempenho animal (Cassuce, 2011).

Ambientes com temperaturas elevadas são responsáveis por vários distúrbios fisiológicos e metabólicos, como a redução no nível hormonal de tri-iodotironina (T3) (Geraert et al., 1996; Mashaly et al., 2004; Melesse et al., 2011; Willemsen et al.,

2011), alcalose respiratória em função do desequilíbrio ácido-básico (Borges et al., 2003), a inibição do funcionamento normal do sistema imune (Mashaly et al., 2004), aumento na taxa de degradação muscular (Yunianto et al., 1997), redução nos níveis de IGF-I (Willemsen et al., 2011), que pode ocasionar menor síntese proteica e aumentar a taxa de degradação, e o aumento na concentração plasmática de corticosterona (Willemsen et al., 2011), caracterizando o estresse térmico nas aves. Esses efeitos têm reflexo direto sobre características produtivas do animal, onde se observa pior desempenho animal em função do menor consumo de ração, menor ganho de peso e pior conversão alimentar (Sohail et al., 2012).

2.2. Estresse oxidativo

Durante a produção de energia pelo organismo, nem todo o oxigênio utilizado como acceptor de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial serão reduzidos à água, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que possuem uma potente função oxidante (Turrens, 2003; Ray et al., 2012). As espécies reativas de oxigênio podem atuar de maneira benéfica como moléculas sinalizadoras em várias reações orgânicas quando em baixa concentração (Dowling e Simmons, 2009), porém altas concentrações de ROS podem danificar biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos (Trachootham et al., 2008; Willemsen et al., 2011), sendo por isso consideradas deletérias ao organismo animal.

As formas mais comuns de ROS são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Ray et al., 2012). Nos processos biológicos, em especial na cadeia transportadora de elétrons mitocondriais, a partir da adição de um elétron a um oxigênio molecular o superóxido é formado. E na reação denominada dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), o superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio, que por sua vez pode interagir com o íon ferro ou cobre para formar o íon hidroxila, que é altamente reativo nos sistemas biológicos. O H_2O_2 alternativamente pode ser convertido em moléculas de água, pela ação das enzimas glutathione peroxidase e catalase (Droge, 2002).

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a eliminação destas, devido à deficiência de mecanismos de defesa antioxidante (Sies, 1997), caracteriza o estresse oxidativo desencadeado por diversos fatores, entre eles o

estresse térmico (Mujahid et al., 2005; Mujahid et al., 2007). Segundo Lin et al. (2006), a influência do estresse térmico pode ser possivelmente porque altas temperaturas corporais induzem alterações nas respostas metabólicas, que estão envolvidas na indução do estresse oxidativo, em função de acelerar a produção de ROS. De acordo com Yang et al. (2010), aves submetidas a ambientes com alta temperatura podem apresentar redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, que conseqüentemente induz à produção adicional de ROS.

O mecanismo exato pelo qual o estresse térmico induz o estresse oxidativo não é completamente conhecido; Mujahid et al. (2006) sugerem que a proteína desacopladora (UCP aviária) pode estar envolvida no controle de produção de ROS, e na proteção das células contra os efeitos deletérios do ROS. Os mesmos autores ainda sugerem que produção adicional de ROS pode ocorrer em função do menor nível de expressão da UCP aviária.

Um dos efeitos do estresse térmico que apresenta efeito comum ao do estresse oxidativo, segundo Del Vesco et al. (2015) é a redução na atividade da enzima creatina quinase (CK), que é considerada como um marcador do estresse oxidativo. Melesse et al. (2011) também observaram em seu estudo realizado com galinhas poedeiras que houve redução na atividade da enzima CK, quando as mesmas foram expostas a um ambiente com temperatura elevada.

2.3. Sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser eliminadas do organismo por meio de substâncias antioxidantes. Como descrito por Stinefelt (2003), antioxidantes são substâncias presentes nos sistemas biológicos que podem ser oxidados por ROS, e que de maneira benéfica diminuem a taxa de reação do ROS com membranas lipídicas, proteínas e DNA. Para evitar maiores danos ocasionados por ROS, o organismo animal dispõe de diversos mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante, como os baseados nas ações das enzimas superóxido dismutase (SOD) (Halliwell e Cross, 1994; Aluwong et al., 2013), do sistema da glutathiona (Mahmoud e Edens, 2003) e da catalase (Weydert e Cullen, 2010).

A enzima superóxido dismutase (SOD) está presente no organismo dos animais sob diferentes formas com distintas localizações: a enzima superóxido dismutase contendo manganês em seu sítio ativo (Mn-SOD) está presente nas mitocôndrias, e a SOD que

contém cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZn-SOD) é encontrada no citosol (Halliwell, 1994). Juntas, essas formas atuam auxiliando no controle da produção de radicais livres. A SOD é fundamental na eliminação do superóxido, gerando nessa reação denominada dismutação o peróxido de hidrogênio e oxigênio. O peróxido de hidrogênio formado pode ser eliminado através de reações catalisadas pela enzima catalase ou pelo sistema da glutathione (Fang et al., 2002).

Adicionalmente, antioxidantes não enzimáticos que podem ser obtidos a partir da dieta, como a vitamina E, vitamina C, carotenoides, flavonoides, oligoelementos (zinco, cobre, selênio e magnésio) podem auxiliar no mecanismo de defesa do corpo contra as espécies reativas de oxigênio (Kuss, 2005). O ácido úrico produzido no organismo como um produto da degradação das purinas, também apresenta um importante papel no combate ao ROS (Ames et al., 1981). Essa característica do ácido úrico assume importância em aves, pois as mesmas apresentam maior taxa metabólica (Ogburn et al., 1998) e podem conseqüentemente produzirem mais substâncias oxidantes em relação aos mamíferos de tamanho corporal semelhante (Simoyi et al., 2002).

O aminoácido essencial metionina está entre os diversos nutrientes conhecidos que podem agir como antioxidantes (Levine et al., 1996) e, assim, pode atenuar os efeitos prejudiciais do ROS às células. Isso porque além de estar envolvida na síntese da glutathione (Wang et al., 1997; Németh et al., 2004), este aminoácido apresenta efeito antioxidante direto de proteção sobre o estresse oxidativo (Levine et al., 2000), por ser um dos resíduos mais prontamente oxidados nas proteínas (Swennen et al., 2011). A metionina, ao reagir com o ROS, é oxidada de maneira reversível, formando metionina sulfóxido. A enzima metionina sulfóxido redutase A (MsrA) então catalisa a reação de redução da metionina sulfóxido a metionina (Weissbach et al., 2005), sendo esse processo dependente da enzima tioredoxina (TRx). Após a redução dos resíduos de metionina nas proteínas, as mesmas podem voltar a reagir com ROS. A enzima tioredoxina é oxidada na reação, e então é reduzida novamente a tioredoxina através da reação catalisada pela enzima tioredoxina redutase (TRxR), à custa de NADPH (Koháryová e Kollárová, 2008). A partir desse coordenado e complexo ciclo enzimático pode ocorrer então a eliminação catalítica de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio dependentes de resíduos de metionina (revisado por Luo e Levine, 2009).

LITERATURA CITADA

- Abu-Elheiga, L., W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis, and S. J. Wakil. 2000. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(Suppl. 4):1444-1449. doi: 10.1073/pnas.97.4.1444
- Ahima, R. S., and D. A. Antwi. 2008. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37(Suppl. 4):811-823. doi: 10.1016/j.ecl.2008.08.005
- Ahmed, S., and S. Harvey. 2002. Ghrelin: a hypothalamic GH-releasing factor in domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol.* 172:117-125. doi: 10.1677/joe.0.1720117
- Al-Marzooqi, W., and S. Leeson. 1999. Evaluation of dietary supplements of lipase, detergent, and crude porcine pancreas on fat utilization by young broiler chicks. *Poult. Sci.* 78:1561-1566. doi: 10.1093/ps/78.11.1561
- Aluwong, T., M. Kawu, M. Raji, T. Dzenda, F. Govwang, V. Sinkalu, and J. Ayo. 2013. Effect of yeast probiotic on growth, antioxidant enzyme activities and malondialdehyde concentration of broiler chickens. *Antioxidants (Basel)* 2(Suppl. 4):326-339. doi:10.3390/antiox.2040326
- Alves, F. M. S., G. A. Felix, P. I. C. L. Almeida, I. A. Nääs, G. M. Souza, F. R. Caldara, and R. G. Garcia. 2012. Impact of exposure to cold on layer production. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 14(Suppl. 3):159-232. doi.org/10.1590/S1516-635X2012000300010
- Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schwiers, and P. Hochstein. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(Suppl. 11):6858-6862.
- Anand, B. K., and J. R. Brobeck. 1951. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24(Suppl. 2):123-140.
- Andersson, U., K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling, and C. J. Small. 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* 279:12005-12008. doi: 10.1074/jbc.C300557200
- Ariyasu, H., K. Takaya, T. Tagami, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Suda, T. Koh, K. Natsui, S. Toyooka, G. Shirakami, T. Usui, A. Shimatsu, K. Doi, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2001. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(Suppl. 10):4753-4758.
- Baas, A. F., J. Boudeau, G. P. Sapkota, L. Smit, R. Medema, N. A. Morrice, D. R. Alessi, and H. C. Clevers. 2003. Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J.* 22(Suppl. 12):3062-3072. doi: 10.1093/emboj/cdg292
- Baião N. C., and L. J. C. Lara. 2005. Oil and fat in broiler nutrition. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 7(Suppl. 3):129-141. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2005000300001
- Belgardt, B. F., and J. C. Bruning. 2010. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 1212:97-113. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05799.x

- Benoit, S. C., E. L. Air, L. M. Coolen, R. Strauss, A. Jackman, D. J. Clegg, R. J. Seeley, and S. C. Woods. 2002. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 22(Suppl. 20):9048-9052.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2012. *Bioquímica*. 6th rev. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Bertechini, A. G. 2012. *Nutrição de monogástrico*. 2nd rev. ed. UFLA, Minas Gerais.
- Bicknell, A. B. 2008. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J. Neuroendocrinol.* 20(Suppl. 6):692-699. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01709.x
- Borges, S. A., A. Maiorka, and A. V. F. Silva. 2003. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Cienc Rural* 33:975-981. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000500028>
- Boswell, T., I. C. Dunn, and S. A. Corr. 1999. Hypothalamic neuropeptide Y mRNA is increased after feed restriction in growing broilers. *Poult. Sci.* 78:1203-1207.
- Boudeau, J., A. F. Baas, M. Deak, N. A. Morrice, A. Kieloch, M. Schutkowski, A. R. Prescott, H. C. Clevers, and D. R. Alessi. 2003. MO25 α/β interact with STRAD α/β enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* 22(Suppl. 19):5102-5114. doi: 10.1093/emboj/cdg490
- Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling, and T. Hökfelt. 1998. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:15043-15048.
- Brink, J., S. J. Ludtke, C-Y. Yang, Z-W. Gu, S. J. Wakil, and W. Chiu. 2002. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(Suppl. 1):138-143. doi: 10.1073/pnas.012589499
- Burke, J. E., and E. A. Dennis. 2009. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50:S237-S242. doi:10.1194/jlr.R800033-JLR200
- Buteri C. B. I., F. C. Tavernari, G. R. Lelis, H. S. Rostagno, and L. F. T. Albino. 2009. Effects of different nutritional plans on broiler performance. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 11(Suppl. 4):225-234. doi: doi.org/10.1590/S1516-635X2009000400003
- Buyse, J., S. Janssen, S. Geelissen, Q. Swennen, H. Kaiya, V. M. Darras, and S. Dridi. 2009. Ghrelin modulates fatty acid synthase and related transcription factor mRNA levels in a tissue-specific manner in neonatal broiler chicks. *Peptides* 30(Suppl. 7):1342-1347. doi: 10.1016/j.peptides.2009.04.015
- Cahaner, A., and F. Leenstra. 1992. Effects of high temperature on growth and efficiency of male and female broilers from lines selected for high weight gain, favorable feed conversion, and high or low fat content. *Poult. Sci.* 71(Suppl. 8):1237-1250. doi: 10.3382/ps.0711237
- Carling, D., M. J. Sanders, and A. Woods. 2008. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (London)* 32(Suppl. 4):S55-S59. doi: 10.1038/ijo.2008.124
- Carmena, R., P. Duriez, and J-C.Fruchart. 2004. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 109:2-7. doi: 10.1161/01.CIR.0000131511.50734.44
- Cassuce, D. C. 2011. Determinação das faixas de conforto térmico para frangos de corte de diferentes idades criados no Brasil. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Castellani, L. W., and A. J. Lusis. 2001. ApoA-II versus apoA-I. Two for one is not always a good deal. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1870-1872.
- Chaput, J. P., and A. Tremblay. 2009. The glucostatic theory of appetite control and the risk of obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* 33:46-53. doi:10.1038/ijo.2008.221.

- Chaudhri, O. B., K. Wynne, and S. R. Bloom. 2008. Can gut hormones control appetite and prevent obesity?. *Diabetes Care* 31(Suppl. 2):S284-S289. doi: 10.2337/dc08-s269.
- Chelikani, P. K., A. C. Haver, and R. D. Reidelberger. 2005. Intravenous infusion of peptide YY(3-36) potently inhibits food intake in rats. *Endocrinology* 146(Suppl. 2):879-888. doi: 10.1210/en.2004-1138
- Chen, S-H., G. Habib, C-Y. Yang, Z-W. Gu, B. R. Lee, S-A. Weng, S. R. Silberman, S-J. Cai, J. P. Deslypere, M. Rosseneu, A. M. Gotto, J. W-H. Li, and L. Chan. 1987. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238(Suppl. 4825):363-366.
- Chen, K.-L., W.-T. Chi, and P. W.-S. Chiou. 2005. Caponization and testosterone implantation effects on blood lipid and lipoprotein profile in male chickens. *Poult. Sci.* 84:547-552. doi: 10.1093/ps/84.4.547
- Chen, L-L., Q-Y. Jiang, X-T. Zhu, G. Shu, Y-F. Bin, X-Q. Wang, P. Gao, and Y-L. Zhang. 2007. Ghrelin ligand-receptor mRNA expression in hypothalamus, proventriculus and liver of chicken (*Gallus gallus domesticus*): studies on ontogeny and feeding condition. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 147(Suppl. 4):893-902. doi:10.1016/j.cbpa.2007.02.017
- Cheng, T. K., M. L. Hamre, and C. N. Coon. 1997. Effect of environmental and energy levels on temperature, dietary protein, broiler performance. *J Appl Poult Res.* 6:1-17.
- Cherian, G., F. W. Wolfe, and J. S. Simma. 1996. Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poult. Sci.* 75:423-431. doi: 10.3382/ps.0750423
- Chesworth, J. M., Stuchbury, T. and Scaife, J. R. 1998. *An Introduction to Agricultural Biochemistry*. 1st ed. Chapman & Hall, London.
- Cheung, C. C., D. K. Clifton, and R.A. Steiner. 1997. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492.
- Chronwall, B. M., D. A. DiMaggio, V. J. Massari, V. M. Pickel, D. A. Ruggiero, and T. L. O'donohue. 1985. The anatomy of neuropeptide-y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15(Suppl. 4):1159-1181.
- Cladaras, C., M. Hadzopoulou-Cladaras, R. T. Nolte, D. Atkinson, and V. I. Zannis. 1986. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *The EMBO J.* 5(Suppl. 13):3495-3507.
- Coll, A. P., A. P., I. S. Farooqi, and S. O'Rahilly. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell* 129:251-262. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.001
- Couillard, C., N. Bergeron, A. Pascot, N. Alméras, J. Bergeron, A. Tremblay, D. Prud'homme, and J-P. Després. 2002. Evidence for impaired lipolysis in abdominally obese men: postprandial study of apolipoprotein B-48- and B-100-containing lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(Suppl. 2):311-318.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdán, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone, and M. J. Low. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(Suppl. 6836):480-484. doi:10.1038/35078085
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschöp, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone, and T. L. Horvath. 2003. The distribution and mechanism of

- action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661. doi:10.1016/S0896-6273(03)00063-1
- Crespo, C. S., A. P. Cachero, L. P. Jiménez, V. Barrios, and E. A. Ferreiro. 2014. Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:(Suppl. 58):1-13. doi: 10.3389/fendo.2014.00058
- Crute, B. E., K. Seefeld, J. Gamble, B. E. Kemp, and L. A. Witters. 1998. Functional domains of the α 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273:35347-35354. doi: 10.1074/jbc.273.52.35347
- Cruz, V. A. R., F. S. Schenkel, R. P. Savegnago, N. V. Grupioni, N. B. Stafuzza, M. Sargolzaei, A. M. G. Ibelli, J. O. Peixoto, M. C. Ledur, and D. P. Munari. 2015. Association of apolipoprotein B and adiponectin receptor 1 genes with carcass, bone integrity and performance traits in a paternal broiler line. *PLOS One* 10(Suppl. 8):e0136824. doi: 10.1371/journal.pone.0136824
- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, and D. S. Weigle. 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719. doi: 10.2337/diabetes.50.8.1714
- Cummings, D. E., and J. Overduin. 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.* 117(Suppl. 1):13-23.
- Danielsson, H. 1963. Influence of bile acids on digestion and absorption of lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 12:214-219.
- Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, and M. Nakazato. 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141(Suppl. 11):4255-4261. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.141.11.7757>
- Davidson N. O., and G. S. Shelness. 2000. Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.* 20:169-193.
- Davies, S. P., N. R. Helps, P. T.W. Cohen, and D. G. Hardie. 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2Ca and native bovine protein phosphatase-2Ac. *FEBS Lett.* 377(Suppl. 3):421-425.
- Deeb, N., and S. J. Lamont. 2002. Genetic architecture of growth and body composition in unique chicken populations. *J. Hered.* 93(Suppl. 2):107-118.
- Del Vesco, A. P., E. Gasparino, D. O. Grieser, V. Zancanela, M. A. M. Soares, and A. R. O. Neto. 2015. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes of acute heat stress-exposed broilers. *Br. J. Nutr.* 113(Suppl. 04):549-559. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114514003535>
- Delhanty, P. J., S. J. Neggers, and A. J. van der Lely. 2012. Mechanisms in endocrinology: Ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur. J. Endocrinol.* 167:601-608. doi: 10.1530/EJE-12-0456
- Denbow, D. M. 1994. Peripheral regulation of food intake in poultry. *J Nutr.* 124(Suppl. 8):1349S-1354S.
- Donma, M. M., and O. Donma. 1989. Apolipoproteins: biochemistry, methods and clinical significance. *Biochem. Educ.* 17(Suppl. 2):63-68.
- Dowling, D. K., and L. W. Simmons. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. Biol. Sci.* 276(Suppl. 1663):1737-1745. doi: 10.1098/rspb.2008.1791
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82(Suppl. 1):47-95.

- Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam. 1996. Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* 320:345-357.
- Eva, C., M. Serra, P. Mele, G. Panzica, and A. Oberto. 2006. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol.* 27:308-339. doi:10.1016/j.yfrne.2006.07.002
- Fang, Y. Z., S. Yang, and G. Wu. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Felies, M., S. von Hörsten, R. Pabst, and H. Nave. 2004. Neuropeptide Y stabilizes body temperature and prevents hypotension in endotoxaemic rats. *J. Physiol.* 561(Pt 1):245-252. doi: 10.1113/jphysiol.2004.073635
- Ferket, P. R., and A. G. Gernat. 2006. Factors that affect feed intake of meat birds: a review. *Int. J. Poult. Sci.* 5(Suppl. 10):905-911.
- Ferrini, F., C. Salio, L. Lossi, and A. Merighia. 2009. Ghrelin in central neurons. *Curr Neuropharmacol* 7(Suppl. 1):37-49. doi: 10.2174/157015909787602779
- Fielding, C. F., and P. E. Fielding. 1995. Molecular transport physiology of reverse cholesterol. *J. Lipid Res.* 36(Suppl. 2):211-228.
- Folmes, C. D. L., and G. D. Lopaschuk. 2007. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovascular Research.* 73:278-287. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.008>
- Forti, N., and J. Diament. 2006. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arq. Bras. Cardiol.* 87:672-679. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2006001800019>
- Forti, N., and J. Diament. 2007. Apolipoproteínas B e A-I: fatores de risco cardiovascular?. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 53(Suppl. 3):276-282. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302007000300029>
- Fouad, A. M., and H. K. El-Senousey. 2014. Nutritional factors affecting abdominal fat deposition in poultry: a review. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 27(Suppl. 7):1057-1068. doi: 10.5713/ajas.2013.13702
- Fox, D. G., C. A. Baile, H. R. Conrad, R. Ewan, Ling-Jung. Koong, G. L. Rumsey, P. W. Waldroup, J. G. Morris, F. Aherne, R. E. Austic, J. H. Clark, D. E. Johnson, R. J. M. Junior, F. N. Owens, G. L. Rumsey, and D. W. Waldo. 1987. Predicting feed intake of food-producing animals. National Academy Press. Washington.
- Fruebis, J., Tsu-Shuen. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. S. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain, and H. F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(Suppl. 4):2005-2010.
- Fu, L-Y., and A. N. V. Pol. 2008. Agouti-related peptide and MC3/4 receptor agonists both inhibit excitatory hypothalamic ventromedial nucleus neurons. *J Neurosci.* 28(Suppl. 21):5433-5449. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0749-08.2008
- Fu, Z., E. R. Gilbert, and D. Liu. 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 9(Suppl. 1):25-53.
- Furlan, R. L., and M. Macari. 2002. Termorregulação. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzales, editor, *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 1st ed. Funep/Unesp, Jaboticabal, Brazil. p. 209-230.
- Furlan, R. L., and M. Macari. 2002. Lipídios: Digestão e absorção. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzales, editor, *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 1st ed. Funep/Unesp, Jaboticabal, Brazil. p. 143-148.

- Furlan R. L. 2006. Influência da temperatura na produção de frangos de corte. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó. Anais... Chapecó: [s.n.], 2006. p. 104-135.
- Furuse, M., M. Matsumoto, N. Saito, K. Sugahara, and S. Hasegawa. 1997. The central corticotropin-releasing factor and glucagon-like peptide-1 in food intake of the neonatal chick. *Eur J Pharmacol.* 339:211-214. doi: 10.1016/S0014-2999(97)01391-5
- Furuse, M., T. Tachibana, A. Ohgushi, R. Ando, T. Yoshimatsu, and D. M. Denbow. 2001. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett.* 301(Suppl. 2):123-126. doi:10.1016/S0304-3940(01)01621-4
- Gan, R-Y., and H-B. Li. 2014. Recent progress on liver kinase B1 (LKB1): expression, regulation, downstream signaling and cancer suppressive function. *Int J Mol Sci* 15(Suppl. 9):16698-16718. doi: 10.3390/ijms150916698
- Garcia, L. A. F. 2004. Economias de escala na produção de frangos de corte no Brasil. PhD Thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Garret, R. H., and Grisham, C. M. 2010. *Biochemistry*. 4th rev. ed. Brooks/Cole, Cengage Learning, Virginia.
- Gaya, L. G., G. B. Mourão, and J. B. S. Ferraz. 2006. Aspectos genético-quantitativos de características de desempenho, carcaça e composição corporal em frangos. *Cienc Rural* 36(Suppl. 2):709-716. doi: doi.org/10.1590/S0103-84782006000200058
- Geelissen, S. M. E., I. M. E. Beck, V. M. Darras, E. R. Kühn, and S. Van der Geyten. 2003. Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms. *Gen Comp Endocrinol.* 134(Suppl. 2):167-174. doi:10.1016/S0016-6480(03)00250-8
- Geraert, P. A., J. C. F. Padilha, and S. Guillaumin. 1996. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure chickens: biological and endocrinological variables. *Br. J. Nut.* 75:205-216.
- Gerber, L. F. P. 2002. Absorção e metabolismo da gordura em frangos de corte. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/gordura.pdf> (Acesso em: janeiro de 2016).
- Ghisla, S., and C. Thorpe. 2004. Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur. J. Biochem.* 271(Suppl. 3):494-508.
- Gietzen, D. W. 1993. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr.* 123(Suppl. 4):610-625.
- Ginsberg, H. N. 1998. Lipoprotein physiology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27(Suppl. 3):503-519.
- Ginsberg, H. N. 2002. New perspectives on atherogenesis. Role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolismo. *Circulation.* 106: 2137-2142. doi: 10.1161/01.CIR.0000035280.64322.31
- Goldberg, I. J., C. A. Scheraldi, L. K. Yacoub, U. Saxena, and C. L. Bisgaier. 1990. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 265(Suppl. 8):4266-4272.
- Goldberg, I. J., R. H. Eckel, and N. A. Abumrad. 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J. Lipid Res.* 50:S86-S90. doi: 10.1194/jlr.R800085-JLR200

- Gonzales, E. 2002. Ingestão de alimentos: mecanismos regulatórios. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzales, editor, Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. 1st ed. Funep/Unesp, Jaboticabal, Brazil. p. 187-199.
- Grider, J. R. 1994. Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J. Nutr.* 124(Suppl. 8):1334S-1339S.
- Griffin, H., G. Grant, and M. Perry. 1982. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase in vitro. *Biochem. J.* 206(Suppl. 3):647-654. doi: 10.1042/bj2060647
- Guyton, A. C., and J. E. Hall. 2006. Tratado de Fisiologia Médica. 11th rev. ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Hagan, M. M., P. A. Rushing, M. W. Schwartz, K. A. Yagaloff, P. Burn, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 1999. Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J. Neurosci.* 19(Suppl. 6):2362-2367.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344(Suppl. 8924):721-724.
- Halliwell, B., and C. E. Cross. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102(Suppl. 10):5-12.
- Hardie, D. G., and Carling, D. 1997. The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246(Suppl. 2):259-273. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x
- Hardie, D. G., J. W. Scott, D. A. Pan, and E. R. Hudson. 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 546(Suppl. 1):113-120. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00560-X
- Hardie, D. G. 2007. AMPK and SNF1: snuffing out stress. *Cell Metab.* 6(Suppl. 5):339-340. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.001
- Harvey, R. A., and D. R. Ferrier. 2012. Bioquímica Ilustrada. 5th rev ed. Artmed. Porto Alegre.
- Havenstein, G. B., P. R. Ferket, and M. A. Qureshi. 2003. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.* 82:1500-1508.
- Hawley, S. A., A. E. Gadalla, G. S. Olsen, and D. G. Hardie. 2002. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 51(Suppl. 8):2420-2425. doi: 10.2337/diabetes.51.8.2420
- Hawley, S. A., J. Boudeau, J. L. Reid, K. J. Mustard, L. Udd, T. P. Mäkelä, D. R. Alessi, and D. G. Hardie. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADA β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2(Suppl. 4):28.1-28.16. doi: 10.1186/1475-4924-2-28
- Hayashi, T., M. F. Hirshman, E. J. Kurth, W. W. Winder, and L. J. Goodyear. 1998. Evidence for 5'AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47(Suppl. 8):1369-1373.
- Hen, G., S. Yosefi, V. Simchaev, D. Shinder, V. J. Hruby, and M. Friedman-Einat. 2006. The melanocortin circuit in obese and lean strains of chicks. *J. Endocrinol.* 190(Suppl. 2):527-535. doi: 10.1677/joe.1.06783
- Hendricks, G. L., J. A. Hadley, S. M. Krzysik-Walker, K. S. Prabhu, R. Vasilatos-Younken, and R. Ramachandran. 2009. Unique profile of chicken adiponectin, a predominantly heavy molecular weight multimer, and relationship to visceral adiposity. *Endocrinology* 150(Suppl. 7):3092-3100. doi: 10.1210/en.2008-1558
- Hermier, D., 1997. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J. Nutr.* 127(Suppl. 5):805S-808S.

- Hillgartner, F. B. T. Charron, and K. A. Chesnut. 1996. Alterations in nutritional status regulate acetyl-CoA carboxylase expression in avian liver by a transcriptional mechanism. *Biochem. J.* 319:263-268
- Honda, K., H. Kamisoyama, T. Saneyasu, K. Sugahara, and S. Hasegawa. 2007. Central administration of insulin suppresses food intake in chicks. *Neurosci. Lett.* 423(Suppl. 2):153-157.
- Horne, P. L. M. V., and T. J. Achterbosch. 2008. Animal welfare in poultry production systems: impact of EU standards on world trade. *Worlds Poult Sci J* 64:40-52.
- Hu, Y., B. T. Bloomquist, L. J. Cornfield, L. B. DeCarr, J. R. Flores-Riveros, L. Friedman, P. Jiang, L. Lewis-Higgins, Y. Sadlowski, J. Schaefer, N. Velazquez, and M. L. McCaleb. 1996. Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J. Biol. Chem.* 271(Suppl. 42):26315-26319.
- Ilnytska, O., and G. Argyropoulos. 2008. The Role of the agouti-related protein in energy balance regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(Suppl. 17): 2721-2731. doi: 10.1007/s00018-008-8104-4
- Innerarity, T. L., R. W. Mahley, K. H. Weisgraber, T. P. Bersot, R. M. Krauss, G. L. Vega, S. M. Grundy, W. Friedl, J. Davignon, and B. J. McCarthy. 1990. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 31(Suppl. 8):1337-1349.
- Ito, T., H. ThidarMyint, T. Murata, H. Inoue, R. M. Neyra, and H. Kuwayama. 2006. Effects of peripheral administration of PYY₃₋₃₆ on feed intake and plasma acyl-ghrelin levels in pigs. *J. Endocrinol.* 191:113-119. doi: 10.1677/joe.1.06855
- Ito, K., M. A. Bahry Y. Hui, M. Furuse, and V. S. Chowdhury. 2015. Acute heat stress up-regulates neuropeptide Y precursor mRNA expression and alters brain and plasma concentrations of free amino acids in chicks. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 187:13-19. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.04.010
- Jang, M., A. Mistry, A. G. Swick, and D. R. Romsos. 2000. Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice. *J. Nutr.* 130(Suppl. 11):2813-2820.
- Jones, T. A., C. A. Donnelly, and M. S. Dawkins. 2005. Environmental and management factors affecting the welfare of chickens on commercial farms in the united kingdom and denmark stocked at five densities. *Poult. Sci.* 84:1155-1165.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116(Suppl. 7):1784-1792. doi: 10.1172/JCI29126
- Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling, and D. G. Hardie. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism.* 1(Suppl. 1):15-25. doi:10.1016/j.cmet.2004.12.003
- Kaiya, H., S. V. D. Geyten, M. Kojima, H. Hosoda, Y. Kitajima, M. Matsumoto, S. Geelissen, V. M. Darras, and K. Kangawa. 2002. Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology.* 143(9):3454-3463.
- Kanatani, A., S. Mashiko, N. Murai, N. Sugimoto, J. Ito, T. Fukuroda, T. Fukami, N. Morin, D. J. MacNeil, L. H. T. V. Ploeg, Y. Saga, S. Nishimura, and M. Ihara. 2000. Role of the Y1 Receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 141(Suppl. 3):1011-1016.

- Kask, A., L. Rago, and J. Harro. 1998. Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y1-selective antagonist BIBP3226. *Br J Pharmacol.* 124:1507-1515. doi: 10.1038/sj.bjp.0701969
- Kawakami, S., T. Bungo, R. Ando, A. Ohgushi, M. Shimojo, Y. Masuda, and M. Furuse. 2000. Central administration of α -melanocyte stimulating hormone inhibits fasting- and neuropeptide Y-induced feeding in neonatal chicks. *Eur J Pharmacol.* 398:361-364.
- Kennedy, G. C. 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *The Royal Society.* 140(Suppl. 901):572-592. doi: 10.1098/rspb.1953.0009
- Kermanshahi, H. 1998. The potential of dietary lipases to improve fat utilization in young birds. PhD Thesis, Faculty of Graduate Studies and Research, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canada.
- Kersten, S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2(Suppl. 4):282-286. doi: 10.1093/embo-reports/kve071
- Kheirabad, M. K., B. N. Jahromi, A. Tamadon, A. Ramezani, S. Ahmadloo, F. S. Sarvestan, and O. Koochi-Hosseiniabadi. 2015. Expression of melanocortin-4 receptor mRNA in male rat hypothalamus during chronic stress. *Int J Mol Cell Med* 4(Suppl. 3):182-187.
- Kim, Ki-Han., F. Lopez-Casillas, D. H. Bai, X. Luo, and M. E. Pape. 1989. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* 3(Suppl. 11):2250-2256.
- Kim, M-S., J-Y.Park, C. Namkoong, P-G.Jang, J-W.Ryu, H-S.Song, J-Y.Yun, I-S.Namgoong, J. Ha, I-S.Park, I-K.Lee, B. Viollet, J. H. Youn, H-K.Lee, and K-U. Lee. 2004. Anti-obesity effects of α -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 10(Suppl. 7):727-733. doi:10.1038/nm1061
- Kinzeler, N. R., and K. S. Edwards. 2009. Functional implications for modulating neuropeptide Y gene expression in the dorsomedial hypothalamus. *J Neurosci* 29(23):7389-7391.
- Koháryová, M., and M. Kollárová. 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen. Physiol. Biophys.* 27(Suppl. 2):71-84.
- Kojima, M. and K. Kangawa. 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 85(Suppl. 2):495-522. doi: 10.1152/physrev.00012.2004
- Korbonits, M., S. A. Bustin, M. Kojima, S. Jordan, E. F. Adams, D. G. Lowe, K. Kangawa, and A. B. Grossman. 2000. The Expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(Suppl. 2):881-887. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.2.7190>
- Kowal, R.C., J. Herz, J. L. Goldstein, V. Esser, and M. S. Brown. 1989. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5810-5814.
- Kopp, J., Z-Q. Xua, X. Zhanga, T. Pedrazzinib, H. Herzogc, A. Kressea, H. Wongd, J. H. Walshd, and T. Hökfelta. 2002. Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience.* 111(Suppl. 3):443-532.
- Krogdahl, A. 1985. Digestion and absorption of lipids in poultry. *J. Nutr.* 115(Suppl. 5):675-685.

- Kuenzel, W. J., L. W. Douglass, and B. A. Davison. 1987. Robust feeding following central administration of neuropeptide Y or peptide YY in chicks, *Gallus domesticus*. *Peptides*. 8(Suppl. 5):823-828. doi:10.1016/0196-9781(87)90066-0
- Kunnen, S., and M. V. Eck. 2012. Lecithin-cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J. Lipid Res.* 53:(Suppl. 9):1783-1799. doi: 10.1194/jlr.R024513
- Kuo, A. Yi-Wen. 2003. Genomic and physiological differences for ghrelin and leptin receptor in lines of chickens selected for high and low body weight. PhD Diss. (Doctoral Philosophy), Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Kuss, F. 2005. Agentes oxidantes e antioxidantes. Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2005. http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/ag_oxid_antioxid.pdf. (Acesso em: dezembro de 2015).
- Lai, Chiou-Yan., and J. E. Cronan. 2004. Isolation and characterization of β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. bacteriol.* 186(Suppl. 6):1869-1878. doi: 10.1128/JB.186.6.1869-1878.2004
- Lara, L. J., and M. H. Rostagno. 2013. Impact of heat stress on poultry production. *Animals (Basel)*. 3:356-369. doi: 10.3390/ani3020356
- Leança, C. C., M. Passarelli, E. R. Nakandakare, and E. C. R. Quintão. 2010. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(Suppl. 9):777-784. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-2730201000090000>
- Lee, K., B. Li, X. Xi, Y. Suh, and R. J. Martin. 2005. Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* 146(Suppl. 1):3-10.
- Lei, L., and Z. Lixian. 2012. Effect of 24 h fasting on gene expression of AMPK, appetite regulation peptides and lipometabolism related factors in the hypothalamus of broiler chicks. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 25(Suppl. 9):1300-1308. doi: 10.5713/ajas.2012.12153
- Lei, L., L. Hepeng, L. Xianlei, J. Hongchao, L. Hai, A. Sheikahmadi, W. Yufeng, and S. Zhigang. 2013. Effects of acute heat stress on gene expression of brain-gut neuropeptides in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 91(Suppl. 11):5194-5201. doi: 10.2527/jas.2013-6538.
- Levine, R. L., M. B. S. Laurent, J. Berlett, and E. R. Stadtman. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(Suppl. 26):15036-15040.
- Levine, R. L., J. Moskowitz, and E. R. Stadtman. 2000. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50:301-307.
- Lin, H., H. F. Zhang, R. Du, X. H. Gu, Z. Y. Zhang, J. Buyse, and E. Decuyper. 2005. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. II. Four weeks of age. *Poult. Sci.* 84:1173-1178. doi: 10.1093/ps/84.8.1173
- Lin, H., E. Decuyper, and J. Buyse. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 144(Suppl. 1):11-17.
- Lizcano, J. M., O. Göransson, R. Toth, M. Deak, N. A. Morrice, J. Boudeau, S. A. Hawley, L. Udd, T. P. Mäkelä, D. G. Hardie, and D. R. Alessi. 2004. LKB1 is a

- master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23(Suppl. 4):833-43.
- Luo, S., and R. L. Levine. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 23:464-472. doi: 10.1096/fj.08-118414
- MacNeil, D. J., A. D. Howard, X. Guan, T. M. Fong, R. P. Nargund, M. A. Bednarek, M. T. Goulet, D. H. Weinberg, A. M. Strack, D. J. Marsh, H. Y. Chen, C-P. Shen, A. S. Chen, C. I. Rosenblum, T. MacNeil, M. Tota, E. D. MacIntyre, and L. H.T. Van der Ploeg. 2002. The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 450:93-109.
- Maddineni, S., S. Metzger, O. Ocón, G. Hendricks, and R. Ramachandran. 2005. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 146(Suppl. 10):4250-4256. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-0254>
- Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. J. Rall, and K. H. Weisgraber. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25:1277-1294.
- Mahmoud, K. Z., and F. W. Edens. 2003. Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 136(Suppl. 4):921-934. doi:10.1016/S1096-4959(03)00288-4
- Mashaly, M. M., G. L. Hendricks, M. A. Kalama, A. E. Gehad, A. O. Abbas, and P. H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci.* 83(Suppl. 6):889-894. doi: 10.1093/ps/83.6.889
- Massengo-Tiassé, R. P., and J. E. Cronan. 2009. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* 66(Suppl. 9):1507-1517. doi: 10.1007/s00018-009-8704-7
- Mayes, P. A. 1994. Gliconeogênese e controle da glicose sanguínea. In: Harper: Bioquímica. Murray, R. K, D. K. Granner, and V. W. Rodwell. 7th rev. ed. Atheneu Editora, SP. p. 188-197.
- Mayes, P. A. 1994. Metabolismo dos acilgliceróis e esfingolipídeos. In: Harper: Bioquímica. Murray, R. K, D. K. Granner, and V. W. Rodwell. 7th rev. ed. Atheneu Editora, SP. p. 238-261.
- Mayes, P. A. 1994. Oxidação de ácidos graxos: cetôgenese. In: Harper: Bioquímica. Murray, R. K, D. K. Granner, and V. W. Rodwell. 7th rev. ed. Atheneu Editora, SP. p. 217-228.
- Mbajjorgu, C. A., J. W. Ngambi, and D. D. Norris. 2011. Voluntary feed intake and nutrient composition in chickens. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6:20-28. doi: 10.3923/ajava.2011.20.28
- McGarry, J. D., G. P. Mannaerts, and D. W. Foster. 1977. A possible role for malonyl-coa in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* 60(Suppl. 1):265-270.
- McMinn, J. E., C. W. Wilkinson, P. J. Havel, S. C. Woods, and M. W. Schwartz. 2000. Effect of intracerebroventricular α -MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279(Suppl. 2):R695-R703.
- Melesse, A., S. Maak, R. Schmidt, and G. V. Lengerken. 2011. Effect of long-term heat stress on key enzyme activities and T3 levels in commercial layer hens. *Int. J. Livest. Prod.* 2(Suppl. 7):107-116.
- Meluzzi, A., and F. Sirri. 2008. Welfare of broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* 8(Suppl. 1):161-173.

- Mihaylova, M. M., and R. J. Shaw. 2012. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13(Suppl. 9):1016-1023. doi:10.1038/ncb2329
- Miinalainen, I. J., W. Schmitz, A. Huotari, K. J. Autio, R. Soininen, E. V. L. van Themaat, M. Baes, Karl-Heinz Herzig, E. Conzelmann, and J. K. Hiltunen. 2000. Mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase deficiency in mice results in severe hypoglycemia with stress intolerance and unimpaired ketogenesis. *PLoS Genet.* 5(Suppl. 7):e1000543. doi: 10.1371/journal.pgen.1000543
- Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Young-Bum Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fougelle, P. Ferré, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck, and B. B. Kahn. 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 48:569-574. doi:10.1038/nature02440
- Minokoshi, Y., T. Shiuchi, S. Lee, A. Suzuki, and S. Okamoto. 2008. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition* 24(Suppl. 9):786-790. doi: 10.1016/j.nut.2008.06.002
- Minor, R. K., J. W. Chang, and R. Cabo. 2009. Hungry for Life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299(Suppl. 1):79-88. doi: 10.1016/j.mce.2008.10.044
- Mitchell, H. H., L. E. Card, and W. T. Haines, 1927. The effect of age, sex, and castration on the basal heat production of chickens. *J Agric Res* 34:945-960.
- Mizuno, T. M., H. Makimura, J. Silverstein, J. L. Roberts, T. Lopingco, and C. V. Mobbs. 1999. Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. *Endocrinology* 140 (Suppl. 10):4551-4557. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.140.10.6966>
- Moghimpour, E., A. Ameri, and S. Handali. 2015. Absorption-enhancing effects of bile salts. *Molecules* 20:14451-14473. doi: 10.3390/molecules200814451.
- Mourot, J., and D. Hermier. 2001. Lipids in monogastric animal meat. *Reprod Nutr Dev* 41(Suppl. 2):109-118.
- Mujahid, A., Y. Yoshiki, Y. Akiba, and M. Toyomizu. 2005. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poult. Sci.* 84:307-314.
- Mujahid, A., K. Sato, Y. Akiba, and M. Toyomizu. 2006. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poult. Sci.* 85:1259-1265. doi: 10.1093/ps/85.7.1259
- Mujahid, A., Y. Akiba, and M. Toyomiz. 2007. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poult. Sci.* 86:364-371. doi: 10.1093/ps/86.2.364
- Murphy, K. G., and S. R. Bloom. 2004. Gut hormones in the control of appetite. *Exp Physiol.* 89(Suppl.5):507-516.
- Musa, H. H., and G. H. Chen. 2007. Association of polymorphisms in avian apo VLDL-II gene with body weight and abdominal fat weight. *Afr. J. Biotechnol.* 6(Suppl. 17):2009-2013.
- Naqvi, A. N. 2007. Application of molecular genetic technologies in livestock production: potentials for developing countries. *Advan. Biol. Res.* 1:72-84.
- Neary, N. M., A. Peter Goldstone, and S. R. Bloom. 2004. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology.* 60:153-160. doi: 10.1046/j.1365-2265.2003.01839.x

- Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2011. *Lehninger Principles of biochemistry*. 5th rev. ed. Worth Publishers, New York.
- Németh, K., M. Mézes, T. Gaál, A. Bartos, K. Balogh, and F. Husvéth. 2004. Effect of supplementation with methionine and different fat sources on the glutathione redox system of growing chickens. *Acta Vet. Hung.* 52(Suppl. 3):369-378.
- Neto, A. C. Pezzato, J. R. Sartori, C. Mori, V. C. Cruz, V. B. Fascina, D. F. Pinheiro, L. A. Madeira, and J. C. Gonçalves. 2011. Emulsifier in broiler diets containing different fat sources. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 13(Suppl. 2):119-125. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2011000200006>
- Nichol, K. A., A. Morey, M. H. Couzens, J. Shine, H. Herzog, and A. M. Cunningham. 1999. Conservation of expression of neuropeptide Y5 receptor between human and rat hypothalamus and limbic regions suggests an integral role in central neuroendocrine control. *J. Neurosci.* 19(Suppl. 23):10295-10304.
- Nikolova, N., Z. Pavlovski, N. Milošević, and L. Perić. 2007. The quantity of abdominal fat in broiler chicken of different genotypes from fifth to seventh week of age. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 23:331-338.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51(Suppl. 9):2734-2741.
- Noiva, R. M., A. C. Menezes, and M. C. Peleteiro. 2014. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *BMC Vet. Res.* 10:1-10. doi: 10.1186/s12917-014-0234-3
- Nunes, R. V., A. H. Nascimento, L. F. T. Albino, and Rostagno, H. S. 2000. Resultados de pesquisa em nutrição de aves no Brasil resumo dos ultimos 5 anos. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2:115-139. doi.org/10.1590/S1516-635X2000000200002
- Ocloñ, E., and M. Pietras. 2011. Peripheral ghrelin inhibits feed intake through hypothalamo-pituitary-adrenal axis-dependent mechanism in chicken. *J. Anim. Feed Sci.* 20:118-130.
- Ogburn, C. E., S. N. Austad, D. J. Holmes, J. V. Kiklevich, K. Gollahon, P. S. Rabinovitch, and G. M. Martin. 1998. Cultured renal epithelial cells from birds and mice: enhanced resistance of avian cells to oxidative stress and DNA damage. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 53(Suppl. 4):B287-B292.
- Ohlrogge, J. B., and J. G. Jaworski. 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:109-136.
- Olivecrona, G., and U. Beisiegel. 1997. Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17(Suppl. 8):1545-1549.
- Olsen, J. G., A. Kadziola, P. Wettstein-Knowles, M. Siggaard-Andersen, and S. Larsen. 2001. Structures of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase I complexed with fatty acids elucidate its catalytic machinery. *Structure* 9(Suppl. 3):233-243.
- Olszewski, P. K., M. M. Wirth, T. J. Shaw, M. K. Grace, C. J. Billington, S. Q. Giraud, and A. S. Levine. 2001. Role of α -MSH in the regulation of consummatory behavior: immunohistochemical evidence. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281(Suppl. 2):R673-R680.
- Oosterveer, M. H., T. H. van Dijk, U. J. F. Tietge, T. Boer, R. Havinga, F. Stellaard, A. K. Groen, F. Kuipers, and Dirk-Jan Reijngoud. 2009. High fat feeding induces hepatic fatty acid elongation in mice. *PLoS ONE* 4(Suppl. 6):e6066. doi: 10.1371/journal.pone.0006066

- Park, B-C. 2006. Amino acid imbalance-biochemical mechanism and nutritional aspects. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 19(Suppl. 9):1361-1368. doi: <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2006.1361>
- Parks, J. S., H. Li, A. K. Gebre, T. L. Smith, and N. Maeda. 1995. Effect of apolipoprotein A-I deficiency on lecithin: cholesterol acyltransferase activation in mouse plasma. *J. Lipid Res.* 36(Suppl. 2):349-355.
- Paton, C. M., and J. M. Ntambi. 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(Suppl. 1):E28-E37. doi: 10.1152/ajpendo.90897.2008.
- Pfaff, F. E. J., and R. E. Austic. 1976. Influence of diet on development of the abdominal fat pad in the pullet. *J. Nutr.* 106:443-450.
- Pires, A. C. 2009. Regulação da secreção de leptina e adiponectina e da expressão de adiponectina por hormônios tireoideanos em ratos. PhD Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, Brasil.
- Poirier, Y., V. D. Antonenkov, T. Glumoff, and J. K. Hiltunen. 2006. Peroxisomal β -oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1763(Suppl. 12):1413-1426. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034
- Pope, T., and J. L. Emmert. 2002. Impact of phase-feeding on the growth performance of broilers subjected to high environmental temperatures. *Poult. Sci.* 81:504-511. doi: 10.1093/ps/81.4.504
- Proszkowiec-Weglarz, M., M. P. Richards, R. Ramachandran, and J. P. McMurtry. 2006. Characterization of the AMP-activated protein kinase pathway in chickens. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 143(Suppl. 1):92-106. doi:10.1016/j.cbpb.2005.10.009
- Quesada, I., E. Tudurí, C. Ripoll, and Á. Nadal. 2008. Physiology of the pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J. Endocrinol.* 199:5-19. doi: 10.1677/JOE-08-0290
- Quinteiro-Filho, W. M., A. Ribeiro, V. F. Paula, M. L. Pinheiro, M. Sakai, L. R. M. Sá, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo-Neto. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89(Suppl. 9):1905-1914. doi: 10.3382/ps.2010-00812
- Rasmussen, B. B. U. C., Holmbäck, E. Volpi, B. Morio-Liondore, D. Paddon-Jones, and R. R. Wolfe. 2002. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 110(Suppl. 11):1687-1693.
- Ray, P. D., B. W. Huang, and Y. Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24(Suppl. 5):981-990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- Richards, M. P., S. M. Poch, and J. P. McMurtry. 2006. Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145:298-310. doi:10.1016/j.ygcen.2005.09.013
- Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poult. Sci.* 86:1478-1490. doi: 10.1093/ps/86.7.1478
- Richards, M. P., R. W. Rosebrough, C. N. Coon, and J. P. McMurtry. 2010. Feed intake regulation for the female broiler breeder: In theory and in practice. *J. Appl. Poult. Res.* 19:182-193. doi: 10.3382/japr.2010-00167

- Rijke, C. E., J. J. G. Hillebrand, L. A. W. Verhagen, T. A. P. Roeling, and R. A. H. Adan. 2005. Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. *J. Mol. Endocrinol.* 35:381-390. doi: 10.1677/jme.1.01808
- Ronnett, G. V., and S. Aja. 2008. AMP-activated protein kinase in the brain. *Int J Obes (Lond)* 32(Suppl 4):S42-48. doi: 10.1038/ijo.2008.122
- Ronnett, G. V., S. Ramamurthy, A. M. Kleman, L. E. Landree, and S. Aja. 2009. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J. Neurochem.* 109(Suppl.1):17-23. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05916.x.
- Ropelle, E. R., J. R. Pauli, K. G. Zecchin, M. Ueno, C. T. Souza, J. Morari, M. C. Faria, L. A. Velloso, M. J. A. Saad, and J. B. C. Carvalheira. 2007. A central role for neuronal adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. *Endocrinology* 148(11):5220-5229.
- Rozkowska, E., and E. Fonberg. 1971. The effects of ventromedial hypothalamic lesions on food intake and alimentary instrumental conditioned reflexes in dogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 31:354-364.
- Roy, A., S. Haldar, Mondal, and T. K. Ghosh. 2010. Effects of supplemental exogenous emulsifier on performance, nutrient metabolism, and serum lipid profile in broiler chickens. *Vet Med Int* 2010:1-9. doi: 10.4061/2010/262604
- Saito, Ei-Suke., H. Kaiya, T. Tachibana, S. Tomonaga, D. Denbow, K. Kangawa, and M. Furuse. 2005. Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotropin-releasing factor system in neonatal chicks. *Regul. Pept.* 125:201-208. doi: 10.1016/j.regpep.2004.09.003
- Sanders, Robert-Jan., R. Ofman, M. Duran, S. Kemp, and R. J. A. Wanders. 2006. ω -Oxidation of very long-chain fatty acids in human liver microsomes. Implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Biol. Chem.* 281(Suppl. 19): 13180-13187. doi: 10.1074/jbc.M513481200
- Sands, J. S., and M. O. Smith. 1999. Broilers in heat stress conditions: effects of dietary manganese proteinate or chromium picolinate supplementation. *J Appl Poult Res* 8:280-287. doi: 10.1093/japr/8.3.280
- Santos, A. C. 2008. Efeito da adiponectina no controle hipotalâmico da fome. PhD Diss. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Médicas. São Paulo, Brazil.
- Sartin, J. L., J. A. Daniel, B. K. Whitlock, and R. R. Wilborn. 2010. Selected hormonal and neurotransmitter mechanisms regulating feed intake in sheep. *Animal* 4:1781-1789. doi: 10.1017/S1751731110001497
- Sartin, J. L., B. K. Whitlock, and J. A. Daniel. 2011. Neural regulation of feed intake: Modification by hormones, fasting, and disease. *J Anim Sci.* 89:1991-2003. doi:10.2527/jas.2010-339
- Sato, K., Y. Akiba, Y. Chida, and K. Takahashi. 1999. Lipoprotein hydrolysis and fat accumulation in chicken adipose tissues are reduced by chronic administration of lipoprotein lipase monoclonal antibodies. *Poult. Sci.* 78:1286-1291. doi: 10.1093/ps/78.9.1286
- Sato, K., K. Fukao, Y. Seki, and Y. Akiba. 2004. Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration. *Poult. Sci.* 83:1342-1347. doi: 10.1093/ps/83.8.1342
- Sato, I., H. Arima, N. Ozaki, M. Watanabe, M. Goto, M. Hayashi, R. Banno, H. Nagasaki, and Y. Oiso. 2005. Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. *J. Neurosci* 25(Suppl. 38):8657-8664. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2739-05.2005

- Sato, K., Y. Cho, S. Tachibana, T. Chiba, W. J. Schneider, and Y. Akiba. 2005. Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. *J. Nutr.* 135(Suppl. 7):1636-1641.
- Sato, K., K. Matsushita, Y. Matsubara, T. Kamada, and Y. Akiba. 2008. Adipose tissue fat accumulation is reduced by a single intraperitoneal injection of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist when given to newly hatched chicks. *Poult. Sci.* 87:2281-2286. doi:10.3382/ps.2008-00086
- Schauer, E., F. Trautinger, A. Köck, A. Schwarz, R. Bhardwaj, M. Simon, J. C. Ansel, T. Schwarz, and T. A. Luger. 1994. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 93(Suppl. 5):2258-2262.
- Scheuermann, G. N., S. F. Bilgili, J. B. Hess, and D. R. Mulvaney. 2003. Breast muscle development in commercial broiler chickens. *Poult. Sci.* 82:1648-1658.
- Serafin, J. A., and M. C. Nesheim. 1970. Influence of dietary heat-labile factors in soybean meal upon bile acid pools and turnover in the chick. *J. Nutrition.* 100:786-796.
- Shalev, B. A., and H. Pasternak. 1998. The relative energy requirement of male vs female broilers and turkeys. *Poult. Sci.* 77:859-863. doi: 10.1093/ps/77.6.859
- Sharma, S., and S. M. Black. 2009. Carnitine homeostasis, mitochondrial function, and cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech* 6:e31-e39. doi:10.1016/j.ddmec.2009.02.001
- Shaw, R. J. M. Kosmatka, N. Bardeesy, R. L. Hurley, L. A. Witters, R. A. DePinho, and L. C. Cantley. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(Suppl. 10):3329-3335.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, D. Vasquez, Seung-Hoi Koo, N. Bardeesy, R. A. DePinho, M. Montminy, and L. C. Cantley. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310(Suppl. 5754):1642-1646. doi: 10.1126/science.1120781
- Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2001. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50(Suppl. 2):227-232. doi: 10.2337/diabetes.50.2.227
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82(Suppl. 2):291-295.
- Silva, C. R. 2012. Desempenho e deposição de nutrientes em frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de lisina. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- Silva, M. T. O. 2013. Desempenho e características de carcaça de três genótipos comerciais de frangos de corte alimentados com diferentes dietas. PhD Diss. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brazil.
- Simoyi, M., K. Van Dyke, and H. Klandorf. 2002. Manipulation of plasma uric acid broiler chicks and its effect on leukocyte oxidative activity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282(Suppl. 3):R791-R796.
- Simpson, K. A., N. M. Martin, and S. R. Bloom. 2009. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab* 53(Suppl. 2):120-128. doi.org/10.1590/S0004-27302009000200002

- Singh, H., M. Brogan, D. Johnson, and A. Poulos. 1992. Peroxisomal β -oxidation of branched chain fatty acids in human skin fibroblasts. *J. Lipid Res.* 33(Suppl. 11):1597-1605.
- Sintubin, P., E. Decuypere, J. Buyse, A. Gertler, R. Whitfield, and S. Dridi. 2011. Leptin and cerulenin differently regulate adiponectin gene expression in chicken liver and hypothalamus. *J Microb Biochem Technol* 3(Suppl. 5):067-072. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000054>
- Skomorucha, I., R. Muchacka, E. S. Cajka, and E. Herbut. 2009. Response of broiler chickens from three genetic groups to different stocking densities. *Ann. Anim. Sci.* 9(Suppl. 2):175-184.
- Slominski, A., J. Wortsman, T. Luger, R. Paus, and S. Solomon. 2000. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 80(Suppl. 3):979-1020.
- Smith, S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *The FASEB J.* 8(Suppl. 15):1248-1259.
- Sohail, M. U., M. E. Hume, J. A. Byrd, D. J. Nisbet, A. Ijaz, A. Sohail, M. Z. Shabbir, and H. Rehman. 2012. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poult. Sci.* 91:2235-2240. doi: 10.3382/ps.2012-02182
- Song, Z., L. Liu, A. Sheikahmadi, H. Jiao, and H. Lin. 2012. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/484869>
- Spady, D. K. 1999. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* 100:576-578. doi: 10.1161/01.CIR.100.6.576
- Stanley, S., K. Wynne, B. McGowan, and S. Bloom. 2005. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 85(Suppl. 4):1131-1158. doi:10.1152/physrev.00015.2004
- Stein, S. C., A. Woods, N. A. Jones, M. D. Davison, and D. Carling. 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J.* 345:437-43.
- Stephens, F. B., D. Constantin-Teodosiu, and P. L. Greenhaff. 2007. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J. Physiol.* 581(Pt. 2):431-444. doi: 10.1113/jphysiol.2006.125799
- Steyrer, E., S. Durovic, S. Frank, W. GieBauf, A. Burger, H. Dieplinger, R. Zechner, and G. M. Kostner. 1994. The role of lecithin: cholesterol acyltransferase for lipoprotein (a) assembly. Structural integrity of low density lipoproteins is a prerequisite for Lp(a) formation in human plasma. *J. Clin. Invest.* 94(Suppl. 6):2330-2340.
- Stinefelt, B. M. 2003. Uric Acid as an Antioxidant and the Effect of Changes in Plasma Uric Acid Concentrations on Broiler Susceptibility to Ascites. PhD Thesis, West Virginia University, Morgantown, WV.
- Stockhorst, U., D. Fries, H-J. Steingrueber, and W. A. Scherbaum. 2004. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol Behav.* 83:47-54. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.022
- Strader, A. D., H. B. Schiöthb, and J. D. Buntin. 2003. The role of the melanocortin system and the melanocortin-4 receptor in ring dove (*Streptopelia risoria*) feeding behavior. *Brain Res.* 960(Suppl. 1-2):112-121. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03799-X
- Stringhini, J. H., M. L. Andrade, L. Andrade, S. A. G. Xavier, M. B. Café, and N. S. M. Leandro. 2006. Desempenho, balanço e retenção de nutrientes e biometria dos

- órgãos digestivos de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de proteína na ração pré-inicial. *R. Bras. Zootec.* 35(Suppl. 6):2350-2358. doi.org/10.1590/S1516-35982006000800022
- Swennen, Q., A. P. Geraert, Y. Mercier, N. Everaert, A. Stinckens, H. Willemsen, Y. Li, E. Decuypere, and J. Buyse. 2011. Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 106(Suppl. 12):1845-1854. doi:10.1017/S0007114511002558
- Tachibana, T., K. Sugahara, A. Ohgushi, R. Ando, S. Kawakami, T. Yoshimatsu, and M. Furuse. 2001. Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neurosci Lett.* 305:131-134.
- Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(Suppl. 12):4908-4911. doi: 0021-972X/00/\$03.00/0
- Takeuchi, S., H. Suzuki, S. Hirose, M. Yabuuchi, C. Sato, H. Yamamoto, and S. Takahashi. 1996. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1306(Suppl. 2-3):122-126. doi: 10.1016/0167-4781(96)00026-7
- Takeuchi, S., and S. Takahashi. 1998. Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol* 112:220-231. doi: 10.1006/gcen.1998.7167
- Takeuchi, S., T. Kudo, and S. Takahashi. 1998. Molecular cloning of the chicken melanocortin 2 ACTH-receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1403:102-108. doi:10.1016/S0167-4889(98)00022-6
- Tatemoto, K. 1982. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:5485-5489.
- Tirawattanawanich, C., S. Chantakru, W. Nimitsantiwong, and S. Tongyai. 2011. The effects of tropical environmental conditions on the stress and immune responses of commercial broilers, Thai indigenous chickens, and crossbred chickens. *J Appl Poult Res* 20:409-420. doi: 10.3382/japr.2010-00190
- Tomas, E., Tsu-Shuen. Tsao, A. K. Saha, H. E. Murrey, C. cheng Zhang, S. I. Itani, H. F. Lodish, and N. B. Ruderman. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(Suppl. 25): 16309-16313.
- Tor, M., J. Estany, D. Villalba, E. Molina, e D. Cubiló. 2002. Comparison of carcass composition by parts and tissues between cocks and capons. *Anim. Res.* 51:421-431. doi: 10.1051/animres:2002035
- Towler, M. C., and D. G. Hardie. 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* 100:328-341. doi: 10.1161/01.RES.0000256090.42690.05
- Trachootham, D., W. Lu, M. A. Ogasawara, N. R.-D. Valle, and P. Huang. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10(Suppl. 8): 1343-1374. doi: 10.1089/ars.2007.1957
- Tsao, T. S., H. E. Murrey, C. Hug, D. H. Lee, and H. F. Lodish. 2002. Oligomerization state-dependent activation of NF- κ B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J. Biol. Chem.* 277(Suppl. 33):29359-29362.

- Tumová, E., and A. Teimouri. 2010. Fat deposition in the broiler chicken: a review. *Scientia Agriculturae Biohemica*. 41(Suppl. 2):121-128.
- Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552(Pt 2):335-344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478
- Vanderweele, D. A. 1994. Insulin is a prandial satiety hormone. *Physiol Behav.* 56(Suppl. 3):619-622.
- Varela, L., and T. L. Horvath. 2012. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO rep.* 13:1079-1086. doi: 10.1038/embor.2012.174
- Vergoni, A.V., and A. Bertolini. 2000. Role of melanocortins in the central control of feeding. *Eur J Pharmacol.* 405:25-32. doi:10.1016/S0014-2999(00)00538-0
- Vieira, S. L. 2010. Consumo das aves domésticas. In: Vieira, S. L., A. Maiorka, A. P. Felix, C. A. Silva, J. M. Forbes, M. Dungelhoef, P. R. F. Muhlbach, and S. G. Oliveira, editor, *Consumo e Preferência Alimentar dos Animais Domésticos*. 1st ed. Phytobiotics Brasil, Londrina, Brazil. p. 268-287.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops, and V. C. Joshi. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 52:537-579.
- Wanders, R. J. A., P. Vreken, S. Ferdinandusse, G. A. Jansen, H. R. Waterham, C. W. T. van Roermund, and E. G. Van Grunsven. 2001. Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 29(Pt 2):250-267.
- Wanders, R. J. A., and J. C. Komen. 2007. Peroxisomes, Refsum's disease and the α - and ω -oxidation of phytanic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 35(Pt 5):865-869. doi: 10.1042/BST0350865
- Wang, C-S., W. J. McConathy, H. U. Kloer, and P. Alaupovic. 1985. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J. Clin. Invest.* 75(Suppl. 2):384-390.
- Wang, S. T., H. W. Chen, L. Y. Sheen, and C. K. Lii. 1997. Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione S-transferase isozymes in rat hepatocytes. *J. Nutr.* 127(Suppl. 11):2135-2141.
- Wang, N., D. L. Silver, P. Costet, and A. R. Tall. 2000. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J. Biol. Chem.* 275(Suppl. 42):33053-33058. doi: 10.1074/jbc.M005438200
- Wang, Y., M. Zhou, K. S. L. Lam, and A. Xu. 2009. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Arq Bras Endocrinol Metab* 53(Suppl. 2):201-212. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000200012>
- Warren, W. A., and J. L. Emmert. 2000. Efficacy of phase-feeding in supporting growth performance of broiler chicks during the starter and finisher phases. *Poult. Sci.* 79:764-770. doi: 10.1093/ps/79.5.764
- Watkinsa, P. A., and J. M. Ellis. 2012. Peroxisomal acyl-CoA synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* 1822(Suppl. 9):1411-1420. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.010.
- Weimar, J. D., C. C. DiRusso, R. Delio, and P. N. Black. 2002. Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of *Escherichia coli* fadD are required for enzyme activity and fatty acid transport. *J. Biol. Chem.* 277(Suppl. 33):29369-29376.

- Weissbach, H., L. Resnick, and N. Brot. 2005. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703(Suppl. 2):203-212. doi:10.1016/j.bbapap.2004.10.004
- Weydert, C. J., and J. J. Cullen. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5(Suppl. 1):51-66. doi: 10.1038/nprot.2009.197
- Willemsen, H., Q. Swennen, N. Everaert, P. A. Geraert, Y. Mercier, A. Stinckens, E. Decuypere, and J. Buyse. 2011. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasm hormone levels, and the redox status of broiler chickens expose to high temperatures. *Poult. Sci.* 90:2311-2320. doi: 10.3382/ps.2011-01353
- Winder, W.W., and D. G. Hardie. 1999. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277(Suppl. 1):E1-E10.
- Witters, L. A., T. D. Watts, D. L. Daniels, and J. L. Evans. 1988. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5473-5477.
- Woods, A., S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, and D. Carling. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 13(Suppl. 22):2004-2008. doi:10.1016/j.cub.2003.10.031
- Woods, S. C., T. A. Lutz, N. Geary, and W. Langhans. 2006. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361(1471):1219-1235. doi: 10.1098/rstb.2006.1858
- Wren, A. M., C. J. Small, H. L. Ward, K. G. Murphy, C. L. Dakin, S. Taheri, A. R. Kennedy, G. H. Roberts, D. G. A. Morgan, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141(Suppl. 11):4325-4328.
- Wren, A. M., L. J. Seal, M. A. Cohen, A. E. Brynes, G. S. Frost, K. G. Murphy, W. S. Dhillo, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(Suppl. 12):5992-5995.
- Yamano, Y., M. Yoshioka, Y. Toda, Y. Oshida, S. Chaki, K. Hamamoto, I. Morishima. 2004. Regulation of CRF, POMC and MC4R gene expression after electrical foot shock stress in the rat amygdala and hypothalamus. *J. Vet. Med. Sci.* 66 (Suppl. 11):1323-1327.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizok, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunodaq, K. Murakamiq, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizuk, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423(Suppl. 6941):762-769. doi:10.1038/nature01705
- Yang, Y., M. Chen, Y. Lai, I. Gantz, A. Yagmurlu, K. E. Georgeson, and C. M. Harmon. 2003. Molecular determination of agouti-related protein binding to human melanocortin-4 receptor. *Mol. Pharmacol.* 64(Suppl. 1):94-103. doi: 10.1124/mol.64.1.94
- Yang, L., G. Y. Tan, Y. Q. Fu, J. H. Feng, and M. H. Zhan. 2010. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comp.*

- Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 151(Suppl. 2):204-208. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.10.010
- Yin, L., Y. Zhang, T. Charron, and F.B. Hillgartner. 2000. Thyroid hormone, glucagon, and medium-chain fatty acids regulate transcription initiated from promoter 1 and promoter 2 of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in chick embryo hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1517:91-99. doi:10.1016/S0167-4781(00)00267-0
- Yin, X., Y. Li, G. Xu, W. An, and W. Zhang. 2009. Ghrelin fluctuation, what determines its production?. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 41(Suppl. 3):188-197. doi: 10.1093/abbs/gmp001
- Yoon, M. J., G. Y. Lee, J. J. Chung, Y. H. Ahn, S. H. Hong, and J. B. Kim. 2006. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor α . *Diabetes* 55(Suppl. 9):2562-2570. doi: 10.2337/db05-1322
- You, M., R. V. Considine, T. C. Leone, D. P. Kelly, and D. W. Crabb. 2005. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 42(Suppl. 3):568-577. doi: 10.1002/hep.20821
- Yunianto, V., K. Hayashi, S. Kaneda, A. Ohtsuka, and Y. Tomita. 1997. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chicken. *Brit. J. Nut.* 77(Suppl. 6):897-909
- Xin, X., L. Zhou, C. M. Reyes, F. Liu, and L. Q. Dong. 2011. APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300(Suppl. 1):E103-E110. doi: 10.1152/ajpendo.00427.2010
- Xu, A., K. W. Chan, R. L. C. Hoo, Y. Wang, K. C. B. Tan, J. Zhang, B. Chen, M. C. Lam, C. Tse, G. J. S. Cooper, and K. S. L. Lam. 2005. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280(Suppl. 18):18073-18080.
- Xue, B., and B. B. Kahn. 2006. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J. Physiol.* 574(Pt 1):73-83. doi: 10.1113/jphysiol.2006.113217
- Zaiou, M., K. S. Arnold, Y. M. Newhouse, T. L. Innerarity, K. H. Weisgraber, M. L. Segall, M. C. Phillips, and S. L.-Katz. 2000. Apolipoprotein E - low density lipoprotein receptor interaction: influences of basic residue and amphipathic α - helix organization in the ligand. *J. Lipid Res.* 41(Suppl. 7):1087-1095.
- Zannis, V. I., S. K. Karathanasis, H. T. Keutmann, G. Goldberger, and J. L. Breslow. 1983. Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: Secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2574-2578.
- Zerehdaran, S., A. L. J. Vereijken, J. A. M. van Arendonk, and E. H. van der D. Waaij. 2004. Estimation of genetic parameters for fat deposition and carcass traits in broilers. *Poult. Sci.* 83:521-525. doi: 10.1093/ps/83.4.521
- Zerehdaran, S., A. L. J. Vereijken, J. A. M. van Arendonk, and E. H. van der Waaij. 2005. Effect of age and housing system on genetic parameters for broiler carcass traits. *Poult. Sci.* 84:833-838. doi: 10.1093/ps/84.6.833
- Zhang, S., H. Li, and H. Shi. 2006. Single marker and haplotype analysis of the chicken apolipoprotein B gene T123G and D⁹500D⁹- polymorphism reveals association with body growth and obesity. *Poult. Sci.* 85(Suppl. 2):178-184. doi: 10.1093/ps/85.2.178

- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. F. Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and D. E. Moller. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108(Suppl. 8):1167-1174. doi:10.1172/JCI200113505
- Zhou, W., M. Murakami, S. Hasegawa, F. Yoshizawa, and K. Sugahara. 2005. Neuropeptide Y content in the hypothalamic paraventricular nucleus responds to fasting and refeeding in broiler chickens. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 141:146-152. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.04.015
- Zhou, J., M. Hegsted, K. L. McCutcheon, M. J. Keenan, X. Xi, A. M. Raggio, and R. J. Martin. 2006. Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity (Silver Spring)* 14(Suppl. 4):683-689. doi: 10.1038/oby.2006.77
- Zhu, M., and S. Zhao. 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int. J. Biol Sci.* 3(Suppl. 7):420-427.
- Zhuo, Z., S. J. Lamont, W. R. Lee, and B. Abasht. 2015. RNA-seq analysis of abdominal fat reveals differences between modern commercial broiler chickens with high and low feed efficiencies. *PLoS ONE* 10(Suppl. 8): e0135810. doi: 10.1371/journal.pone.0135810
- Zukowska-Grojec Z., and A. C. Vaz. 1988. Role of neuropeptide Y (NPY) in cardiovascular responses to stress. *Synapse* 2(Suppl. 3):293-298.

II. OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Com este estudo, os objetivos gerais foram avaliar o desempenho de frangos, a expressão gênica, a atividade enzimática, e marcadores do estresse oxidativo.

Objetivos Específicos:

Capítulo III: Avaliar os efeitos da temperatura ambiental e do sexo sobre o desempenho, e sobre a expressão de genes hipotalâmicos relacionados ao consumo de ração: neuropeptídeo Y (*NPY*), pró-ópiomelanocortina (*POMC*), grelina (*GHRL*), proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) e proteína quinase hepática B1 (*LKB1*) em frangos de corte machos e fêmeas de 42 dias de idade;

Capítulo IV: Avaliar os efeitos do sexo e da idade sobre o desempenho, e sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico: acetil-CoA-carboxilase (*ACC*); ácido graxo sintase (*FAS*), apolipoproteína A-I (*APOA-I*); apolipoproteína B (*APOB*); adiponectina (*ADIPOQ*), proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) e proteína quinase hepática B1 (*LKB1*) em frangos de corte machos e fêmeas de 21 e 42 dias de idade;

Capítulo V: Avaliar o efeito do estresse térmico agudo e da suplementação de metionina sobre o desempenho; sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo de eliminação das espécies reativas de oxigênio: superóxido dismutase (*SOD*), tioredoxina (*Trx*), tioredoxina redutase 1 (*TrxR1*), e metioninina sulfóxido redutase A (*MsrA*); sobre a expressão de catepsina L2 (*CTSL2*); e sobre marcadores biológicos do estresse oxidativo: níveis sanguíneos de ácido úrico, creatinina, e atividade das enzimas alanina aminotransferase (*ALT*), aspartato aminotransferase (*AST*), e creatina quinase (*CK*) em frangos de corte macho de 1-21 e 22-42 dias de idade.

III. ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE GENES HIPOTALÂMICOS E O CONTROLE DO CONSUMO DE RAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE: EFEITOS DO SEXO E DA TEMPERATURA AMBIENTAL

(Journal of Animal Science)

RESUMO- Com este estudo nosso objetivo foi avaliar os efeitos do sexo e da temperatura ambiental sobre o desempenho animal e sobre a expressão de genes hipotalâmicos relacionados ao consumo, como o neuropeptídeo Y (*NPY*), grelina (*GHRL*), pró-ópiomelanocortina (*POMC*), proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) e proteína quinase hepática B1 (*LKB1*). Frangos de corte machos e fêmeas com 42 dias de idade, recebendo dietas formuladas de forma a atender suas exigências nutricionais, foram submetidos a ambiente com temperatura de conforto térmico ou estresse por calor (38°C por 24 horas). Ao compararmos o consumo de ração entre machos e fêmeas, observamos que os machos consumiram maior quantidade de ração. Nas aves submetidas à condição de estresse por calor, podemos notar uma redução no consumo de ração e também perda de peso. Foi observado efeito de interação entre sexo e ambiente sobre a expressão dos genes *NPY* (P=0,0225), *AMPK α -1* (P=0,0398) e *POMC* (P=0,0072). O maior valor de expressão do gene *NPY* foi observado em machos em ambiente de conforto, e o menor valor em machos submetidos ao estresse térmico. Maior expressão do gene *AMPK α -1* foi observada em machos submetidos ao estresse térmico. Com relação à expressão do gene *POMC*, comparando animais que permaneceram em conforto térmico, observamos que fêmeas apresentaram maior expressão deste gene. A expressão do gene *LKB1* (P=0,0256) foi influenciada somente pelo sexo, e a maior expressão para este gene foi observada em machos. Não foi observado nenhum efeito significativo sobre o gene da *GHRL*. Nossos resultados indicam que alguns genes hipotalâmicos relacionados ao consumo podem estar envolvidos nas diferenças observadas no consumo voluntário de ração entre animais de diferentes sexos e expostos a diferentes condições ambientais, e que o controle do consumo ocorre em função do balanço entre a ação de substâncias orexígenas, *NPY* e *AMPK*, e anorexígenas, como o *POMC*.

Palavras chaves: genes hipotalâmicos, genes orexígenos, genes anorexígenos, temperatura ambiental

INTRODUÇÃO

O consumo de ração adequado é um importante fator que permite o melhor desempenho do animal, já que disponibiliza nutrientes ao organismo, e estes somados a outros fatores determinarão a taxa de crescimento, e composição corporal dos animais durante seu ciclo de vida. O controle do consumo voluntário de ração pelos animais envolve uma série de mecanismos que relaciona o sistema nervoso central com os tecidos periféricos do organismo (Richards et al., 2010). Este mecanismo pode ser influenciado por diversos fatores, entre eles o sexo e o ambiente (revisado por Ferket e Gernat, 2006).

Estudos têm demonstrado que a temperatura ambiental pode agir como um importante fator regulando o consumo de ração, uma vez que o consumo de ração parece estar relacionado ao mecanismo de controle da temperatura corporal (Brobeck, 1948; Cheng et al., 1997; Sands e Smith, 1999; Quinteiro-Filho et al., 2010). Dentro desse contexto, na tentativa de melhor compreender como o consumo pode ser afetado pelo estresse por calor, estudos têm demonstrado que o estresse calórico pode influenciar a expressão de genes hipotalâmicos relacionados ao consumo (Song et al., 2012; Ito et al., 2015), uma vez que o hipotálamo além de conter células neuronais responsáveis pelo controle do consumo de alimentos (Simpson et al., 2009), também contém células neuronais sensíveis à temperatura corporal (Braz, 2005)

Aves de diferentes sexos também podem apresentar diferenças no consumo de ração e conseqüentemente no desempenho (Rondelli et al., 2003; Stringhini et al., 2006). De acordo com Bertechini (2012), diferenças no desempenho podem ser atribuídas a algumas diferenças fisiológicas entre os sexos, como a maior taxa de crescimento e maior deposição de proteína observada nos machos em relação às fêmeas, estando essas diferenças intimamente relacionadas com as diferentes necessidades nutricionais. Possivelmente, essas diferenças também possam ser explicadas por diferentes padrões de expressão de genes orexígenos/anorexígenos presentes no hipotálamo de frangos de diferentes sexos (Merckaert e Vandesande, 1996; Kuo, 2003).

Durante os períodos pré-prandial e pós-prandial, sinais hormonais gerados a partir dos tecidos periféricos do organismo (leptina, insulina colecistocinina, entre outros) (Murphy e Bloom, 2004) e sinais não hormonais oriundos de nutrientes (glicose, ácidos graxos livres e aminoácidos) (Lee et al., 2005) são conduzidos até o hipotálamo que então reconhece e interpreta os sinais gerando respostas adequadas de estímulo ou

inibição do consumo (Minokoshi et al., 2004; Xue et al., 2006; Minokoshi et al., 2008). O núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo contém células neuronais responsáveis pela síntese e liberação de neuropeptídeos orexígenos, como o neuropeptídeo Y (NPY), e a proteína relacionada ao agouti (AgRP); e anorexígenos, como o pró-ópiomelanocortina (POMC), e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (Minor et al., 2009). Assim como os neuropeptídeos hipotalâmicos, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e o hormônio grelina também apresentam estreita relação com o controle do consumo de ração. O complexo enzimático AMPK composto por uma subunidade catalítica com duas isoformas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$); e duas subunidades regulatórias (isoformas $\beta 1$, $\beta 2$; e isoformas $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$) (Hardie, 2003), tem sido bastante estudado em função da sua ação hipotalâmica sobre processos relacionados ao consumo de alimento (Xue e Kahn, 2006; Ropelle et al., 2007). A AMPK é ativada quando os níveis de energia fisiológicos (ATP) estão abaixo do normal, e ocorre um aumento na relação AMP:ATP (Towler e Hardie, 2007).

O mecanismo exato pelo qual a AMPK é ativada não é totalmente conhecido, porém o passo principal é a fosforilação do resíduo de treonina 172 presente na subunidade catalítica α (Stein et al., 2000). A fosforilação, e consequente ativação da AMPK, podem ocorrer por meio de diversas enzimas, entre elas a proteína quinase hepática B1 (LKB1), considerada a principal proteína de ativação da AMPK (Shaw et al., 2005). O hormônio grelina encontrado no proventrículo de aves (Richards et al., 2006; Buyse et al., 2009), na hipófise (Korbonits et al., 2000) e no hipotálamo (Cowley et al., 2003; Ferrini et al., 2009), também tem sido relacionado ao consumo de alimentos (Shintani et al., 2001). Embora em mamíferos a grelina atue como uma substância orexígena (Wren et al., 2000), estudos realizados com frangos neonatais têm demonstrado ação inibitória da grelina sobre o consumo de ração (Furuse et al., 2001; Saito et al., 2005; Ocloñ e Pietras, 2011). E esse efeito anorexígeno da grelina em aves parece ser mediado pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) (Saito et al., 2005).

Esse estudo foi desenvolvido sob a hipótese de que fatores como o sexo e a temperatura ambiental podem influenciar o desempenho animal através da expressão de genes relacionados ao consumo de ração. Assim, com este trabalho nosso objetivo foi avaliar os efeitos da temperatura ambiental e do sexo sobre o desempenho animal, e sobre a expressão de genes hipotalâmicos relacionados ao consumo de ração como o neuropeptídeo Y (NPY), grelina (GHRL), pró-ópiomelanocortina (POMC), proteína

quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) e proteína quinase hepática B1 (*LKB1*) em frangos de corte machos e fêmeas de 42 dias de idade que permaneceram em conforto ou foram expostos ao estresse térmico de 38°C por 24 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido de acordo com as especificações do comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá.

Animais e Desenho experimental

Para realização do experimento, 60 fêmeas e 60 machos de frangos de corte (Cobb 500) (*Gallus gallus*) de 21 dias de idade foram utilizados. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2, tendo sido avaliado dois sexos, e dois ambientes. Os animais foram separados por sexo em gaiolas coletivas (10 animais por gaiola), sendo estas as unidades experimentais (N=6). As aves foram criadas em sala climatizada em temperatura de conforto térmico (de acordo com o manual da Cobb) até os 41 dias de idade, quando 30 animais de cada sexo foram submetidos ao estresse térmico agudo de 38°C por 24 horas. Durante o período de estresse, as 60 aves (30 de cada sexo) restantes foram mantidas em temperatura de conforto térmico. Após as 24 horas de estresse, 10 animais de todos os tratamentos (machos no conforto, machos no estresse, fêmeas no conforto, e fêmeas no estresse) foram abatidos por deslocamento cervical aos 42 dias de idade. A temperatura retal foi mensurada em aves sob conforto e estresse térmico.

Durante o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e ração. A dieta foi balanceada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2011), e consistiu-se de uma ração baseada em soja e milho com 19,70% de proteína bruta e 3170 Kcal/Kg de energia. O consumo de ração foi calculado como a diferença entre a quantidade de ração oferecida aos 41 dias de idade e as sobras ao final do experimento (dia 42) para as aves em ambos os ambientes.

Para calcular o ganho de peso das aves em conforto térmico, os animais (machos e fêmeas) foram pesados aos 41 e 42 dias de idade. Para calcular o ganho de peso dos animais do estresse térmico, os animais foram pesados no início (41 dias) e no fim do período de estresse (42 dias). O consumo de ração e o ganho de peso foram corrigidos para a mortalidade.

Expressão Gênica

Para as análises de expressão gênica, amostras do hipotálamo foram coletadas a partir de seis frangos machos e seis frangos fêmeas. Essas amostras foram conservadas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Previamente, todo o material utilizado foi tratado com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O tecido foi triturado com homogeneizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a sua completa dissociação. Em seguida, 200 μL de clorofórmio foram adicionados nas amostras, que foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a $13482 \times g$, a 4°C . A fase aquosa foi coletada e transferida para um tubo limpo, adicionando em seguida 500 μL de isopropanol por tubo, e foram incubadas à temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos. Logo após, as amostras foram suavemente homogeneizadas, e centrifugadas por 10 minutos a $13482 \times g$, a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Mais uma vez, o material foi centrifugado a $13482 \times g$, por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Por fim, deixamos o pelete secando por 15 minutos e em seguida foi ressuspensionado em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 260 nm. E a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para esta reação, adicionamos em um tubo estéril e RNA free 1 μg de RNA total, 1 μL de 10 X DNase I reaction buffer e 1 μL DNase I amplification grade (1 U/ μL). A reação foi então incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, inativamos a DNase I adicionando 1 μL de EDTA a 25 mM, e a reação foi aquecida a 65°C por 10 minutos. Essa etapa foi realizada para remoção de possível contaminação com DNA genômico.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizamos o kit SuperScript™ III First Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) e as reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Logo após à 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 (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse composto, quando em solução, apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR o acúmulo do corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta à formação dos amplicons, podendo desta forma ser detectada e quantificada.

Os primers utilizados nas reações de amplificação foram desenhados de acordo com Lei e Lixian (2012), com as sequências dos genes *NPY*, *AMPK α -1*, *POMC*, *LKB1* e *GHRL* depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso M87294, DQ302133, NM_001031098, NM_001045833, AB075215, respectivamente) (Tabela 1). Foram testados dois controles endógenos, os genes da *β -actina* e do *GAPDH*, sendo utilizado o gene da *β -actina* (número de acesso L08165), por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 μL e em duplicatas.

Tabela 1 - Sequências de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR)

Gene	Amplicom ¹ (pb)	Temperatura (°C) ²	Orientação	Sequências dos primers (5'-3')
<i>NPY</i> ³	101	60°C	Forward	GAGGCACTACATCAACCTCATCA
			Reverse	CTGTTTTCTGTGCTTTCCTCAA
<i>AMPKα-1</i>	266	60°C	Forward	CGGAGATAAACAGAAGCACGAG
			Reverse	CGATTCAGGATCTTCACTGCAAC
<i>LKB1</i>	158	60°C	Forward	TGAGAGGGATGCTTGAATACGA
			Reverse	ACTTGTCCCTTTGTTTCTGGGC
<i>POMC</i>	88	60°C	Forward	CGCTACGGCGGCTTCA
			Reverse	TCTTGTAGGCGCTTTTGACGAT
<i>GHRL</i>	203	60°C	Forward	CCTTGGGACAGAACTGCTC
			Reverse	CACCAATTTCAAAGGAACG
<i>β-actina</i>	136	60°C	Forward	ACCCCAAAGCCAACAGA
			Reverse	CCAGAGTCCATCACAATACC

¹Amplicon, pares de base

²Temperatura de anelamento (°C)

³NPY, Neuropeptídeo Y; AMPK α -1, Proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1; LKB1, Proteína quinase hepática B1; POMC, pró-ópiomelanocortina; GHRL, grelina.

Adaptado de Lei e Lixian (2012).

Os primers analisados foram adequados para as reações de PCR em tempo real. As eficiências de amplificação foram semelhantes para todos os genes de interesse, com 90% a 110% de eficiência. As análises da curva de dissociação não revelaram qualquer produto inespecífico ou formação de dímeros de primers, o que demonstra a confiabilidade dos dados estimados nas expressões de mRNA dos genes avaliados. A β -actina utilizada como controle endógeno não mostrou nenhuma diferença significativa entre as variáveis analisadas, o que confere eficiência a β -actina como controle endógeno.

Análise estatística

O método 2^{-ACT} foi utilizado para as análises de expressão relativa e os resultados são apresentados como unidade arbitrária (UA). Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial inteiramente casualizado, tendo sido avaliado dois sexos (macho e fêmea), e dois ambientes (conforto térmico e estresse por calor). As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Desempenho

Na tabela 2, são apresentados os resultados de consumo de ração e ganho de peso, de machos e fêmeas no ambiente de conforto e estresse térmico. Não foi observado efeito de interação entre sexo e ambiente sobre o consumo de ração e ganho de peso. Entretanto observamos efeito de sexo e ambiente sobre o consumo de ração, e efeito de ambiente sobre o ganho de peso. Com relação ao consumo de ração, ao compararmos machos e fêmeas, podemos observar que os machos consumiram maior quantidade de ração do que as fêmeas. Já os animais submetidos à condição de estresse por calor apresentaram redução no consumo de ração e também perda de peso significativa.

Tabela 2- Consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) em frangos de corte machos e fêmeas de 42 dias

		CR (Kg)		GP (Kg)	
		Média	DP	Média	SD
Macho	Conforto	0,12	0,02	0,08	0,01
	Estresse	0,08	0,03	-0,04	0,03
Fêmea	Conforto	0,08	0,01	0,06	0,01
	Estresse	0,07	0,03	-0,01	0,08
Efeitos principais					
Sexo	Macho	0,10 ^a	0,03	0,02	0,07
	Fêmea	0,07 ^b	0,02	0,03	0,06
Ambiente	Conforto	0,10 ^a	0,03	0,07 ^a	0,02
	Estresse	0,07 ^b	0,03	-0,02 ^b	0,06
Probabilidades					
Sexo		0,0668		0,9316	
Ambiente		0,0687		0,0065	
Interação		0,3685		0,3626	

^{a, b, c} Médias em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($P < 0,07$).

Expressão gênica

Os resultados de expressão dos genes neuropeptídeo Y (*NPY*), proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*), pró-opiomelanocortina (*POMC*), grelina (*GHRL*) e proteína quinase hepática B1 (*LKB1*), nos dois sexos e dois ambientes avaliados, são apresentados na tabela 3. Nós observamos efeito de interação entre sexo e ambiente, sobre a expressão dos genes *NPY* (P=0,0225), *AMPK α -1* (P=0,0398) e *POMC* (P=0,0072). O maior e menor valor de expressão do gene *NPY* foi observado em machos em ambiente de conforto, e em machos submetidos ao estresse térmico, respectivamente. Observando a expressão do gene *AMPK α -1*, verificamos que machos submetidos ao estresse térmico tiveram maior expressão deste gene, seguida por machos no conforto, e pelas fêmeas em ambos os ambientes. Com relação à expressão do *POMC*, comparando animais que permaneceram em conforto térmico, observamos que fêmeas apresentaram maior expressão do gene *POMC* que machos. A expressão do gene *LKB1* (P=0,0256) foi influenciada somente pelo sexo, sendo observado que os machos apresentaram maior expressão do que as fêmeas. Não foi observado nenhum efeito significativo sobre o gene da grelina (*GHRL*).

Tabela 3- Expressão dos genes *NPY*, *AMPK α -1*, *POMC*, *GHRL* e *LKB1* no hipotálamo de frangos de corte machos e fêmeas com 42 dias de idade

		NPY ¹		AMPK α -1		POMC		GHRL		LKB1 ²	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Macho	Conforto	11,57 ^a	2,05	0,45 ^b	0,04	0,04 ^b	0,01	0,03	0,01	1,90	0,65
	Estresse	7,09 ^b	1,87	0,60 ^a	0,15	0,05 ^{ab}	0,01	0,02	0,02	2,08	0,56
Fêmea	Conforto	9,19 ^{ab}	1,53	0,34 ^{bc}	0,05	0,05 ^a	0,01	0,03	0,01	1,23	0,44
	Estresse	9,19 ^{ab}	3,10	0,31 ^c	0,13	0,04 ^b	0,01	0,02	0,01	1,63	0,58
Efeitos principais											
Sexo	Macho	9,33	3,00	0,53	0,13	0,04	0,01	0,03	0,01	1,99 ^a	0,59
	Fêmea	9,19	2,33	0,32	0,09	0,04	0,01	0,03	0,01	1,43 ^b	0,54
Ambiente	Conforto	10,38	2,13	0,40	0,07	0,04	0,01	0,03	0,01	1,56	0,64
	Estresse	8,14	2,67	0,45	0,20	0,04	0,01	0,02	0,01	1,85	0,59
Probabilidades											
Sexo		0,8803		0,0001		0,7128		0,8682		0,0256	
Ambiente		0,0223		0,1967		0,4522		0,1322		0,2200	
Interação		0,0225		0,0398		0,0072		0,4736		0,6378	

^{a, b, c} Médias em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).

¹ NPY, Neuropeptídeo Y; AMPK α -1, Proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1; POMC, Pró-ópiomelanocortina; GHRL, Grelina; LKB1, Proteína quinase hepática B1

² Expresso como unidade arbitrária (UA).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos frangos de corte apresenta forte relação com a genética e o ambiente ao qual o animal é exposto. Aves selecionadas apresentam melhor desempenho, mas também são mais sensíveis aos efeitos da temperatura ambiental (Smith, 1993; Al-Batshan e Hussein, 1999; Oliveira et al., 2013). Estudos demonstram que frangos submetidos à condição de estresse térmico podem apresentar menor consumo de ração com conseqüente redução no ganho de peso (Smith, 1993; Mujahid et al., 2007). Em nosso estudo, observamos que as aves submetidas a condições de estresse por calor por 24 horas reduziram o consumo de ração, assim como apresentaram perda de peso significativa. Possivelmente, no calor as aves reduzem o consumo de ração na tentativa de diminuir o calor adicional gerado durante o metabolismo dos nutrientes (Ferket e Gernat, 2006; Oliveira et al., 2006). Além disso, as aves expostas ao calor agudo desviam maior parte do tempo buscando mecanismos termorregulatórios do que se alimentando, o que resulta em redução no consumo de ração (Lei et al., 2013) com conseqüente perda de peso (Berrong e Washburn, 1998; Mujahid et al., 2005). Algumas das possíveis explicações para a redução no ganho de peso observado em aves sob

condição de estresse por calor seria a redução na área de absorção do intestino (Mitchell e Carlisle, 1992; Quinteiro-Filho et al., 2010), bem como o aumento no nível de corticosterona plasmática (Quinteiro-Filho et al., 2012), uma vez que esse hormônio tem sido associado a maior degradação de proteínas corporais (Yunianto et al., 1997; Lin et al., 2004).

Adicionalmente, o sexo também exerce efeitos sobre o consumo de ração e ganho de peso dos frangos (Smith, 1993). Nesse estudo, observamos que os machos apresentaram maior consumo do que as fêmeas, concordando com os resultados obtidos por (Benyi et al., 2015). Essa diferença observada no consumo de ração entre machos e fêmeas pode ser explicada em parte pela maior taxa de crescimento observada em machos, que esta relacionada à maior capacidade de consumo de ração, que por sua vez está intimamente relacionada à diferença nas exigências nutricionais entre os sexos (Bertechini, 2012).

A avaliação da expressão de genes hipotalâmicos relacionados ao consumo (Boswell et al., 1999; Furuse et al., 2001; Tachibana et al., 2001; Lei e Lixian, 2012) tem sido realizada na tentativa de decifrar os eventos fisiológicos ligados a este processo, uma vez que o balanço entre o consumo de ração e a homeostase energética são mecanismos regulados pelo sistema nervoso central (Lei et al., 2013). O núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo contém células neuronais responsáveis pela síntese e liberação de neuropeptídeos orexígenos, que agem estimulando o consumo, entre eles o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP); e também contém neuropeptídeos anorexígenos com ação inibitória sobre o consumo, como o pró-ópiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (Minor et al., 2009).

Assim, o balanço entre as ações de substâncias orexígenas e anorexígenas determinarão o *status* energético orgânico modulando o consumo de alimento e o peso corporal (Richards e Proszkowiec-Weglarz, 2007). O NPY é considerado como o mais potente peptídeo orexígeno (Kinzeler e Edwards, 2009), e é amplamente expresso no sistema nervoso central (Eva et al., 2006). Ao avaliarmos o efeito do ambiente e do sexo sobre a expressão do gene *NPY* no hipotálamo de frangos, observamos que machos em condição de conforto térmico apresentaram o maior nível de expressão para este gene. Este resultado confirma a ação que o NPY apresenta sobre o estímulo do consumo de ração, já que os maiores níveis de expressão foram observados nos machos que apresentaram efetivamente maior consumo. Ito et al. (2015), ao avaliarem frangos de 14

dias de idade em condição de estresse por calor de 40°C por 2 ou 5 horas, observaram maior valor de expressão do gene *NPY*. O resultado obtido por esses autores difere dos nossos resultados, já que observamos menor nível de expressão do gene *NPY* em machos submetidos ao estresse térmico agudo por 24 horas. Esse resultado sugere que possivelmente a expressão do gene *NPY* em aves submetidas ao estresse térmico pode ter sido suprimida pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) (Bchini-Hooft et al., 1993), que é liberado em resposta a situações estressoras (Quinteiro-Filho et al., 2012).

O complexo enzimático proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também apresenta ação sobre processos relacionados ao consumo de ração (Xue e Kahn, 2006; Ropelle et al., 2007). A ativação da AMPK pode ocorrer em função do estresse ambiental e metabólico, que pode inibir a síntese de ATP ou acelerar a utilização do ATP, causando aumento na relação celular de AMP:ATP (Hardie, 2007; Richard et al., 2010). A proteína quinase hepática B1 (LKB1), também conhecida como serina/treonina quinase 11 (STK11), é um complexo heterotrimérico com duas proteínas acessórias, a pseudoquinase STRAD (proteína adaptadora relacionada à Ste-20) (isoformas α ou β) e a proteína scaffold MO25 (isoformas α ou β) (Boudeau et al., 2003). Essas três unidades juntas formam uma unidade biológica que fosforila e ativa a AMPK (Woods et al., 2003). Em nosso trabalho, podemos observar que machos submetidos ao estresse por calor apresentaram maiores níveis de expressão do gene *AMPK α -1* que codifica a proteína ativada por AMP (AMPK). Embora não tenhamos observado efeito de interação para a expressão do gene proteína quinase hepática B1 (*LKB1*), responsável pela fosforilação e ativação da AMPK, podemos observar efeito de sexo, sendo que os machos apresentaram maior valor de expressão para esse gene.

Nossos resultados confirmam a relação funcional entre a LKB1 e AMPK descrita em aves por (Proszkowiec-Weglarz et al., 2006), e esses resultados sugerem que os machos quando comparado às fêmeas, em ambos os ambientes analisados, apresentam um mecanismo de proteção fisiológico mais eficiente contra a depleção de ATP a partir da ação da LKB1 e AMPK. De acordo com Richards et al. (2010), a AMPK quando ativada no hipotálamo sob condição de estresse estimula a atividade dos neurônios que expressam *NPY/AgRP*, para que ocorra aumento no consumo de alimentos. Apesar de termos observado maior expressão do gene *AMPK α -1* em aves estressadas pelo calor, não observamos maior expressão do gene *NPY*, o que sugere que o controle do consumo de ração mediado pela ação da *AMPK α -1*, nessa condição, possivelmente

ocorra pelo estímulo da $AMPK\alpha-1$ sobre a expressão de outro gene orexígeno o *AgRP* (Lei e Lixian, 2012), necessitando de mais estudos para melhor compreender como a $AMPK\alpha-1$ influencia o consumo de ração.

Ao contrário do NPY e da AMPK, o gene pró-ópiomelanocortina (*POMC*) é codificador de uma substância considerada anorexígena (Varela e Horvath, 2012), que após seu processamento da origem a hormônios peptídicos bioativos, como o hormônio estimulante de melanocortina (MSH α , β e γ) (Schauer et al., 1994; MacNeil et al., 2002). O α -hormônio estimulante de melanocortina (α -MSH), ao se ligar no receptor de melanocortina 3 e/ou 4 localizados no sistema nervoso central (Bicknell, 2008), promove a inibição do consumo de alimentos e o aumento do gasto de energia corporal (Strader et al., 2003). Em nosso trabalho, comparando animais que permaneceram em conforto térmico, observamos que fêmeas apresentaram maior expressão do gene *POMC* que machos. A maior expressão desse gene em fêmeas pode estar relacionada à menor expressão do gene *AMPK $\alpha-1$* , também observada nesse sexo. Menor ação da AMPK tem sido relacionada à ativação da mTOR (proteína alvo da rapamicina), e que por sua vez tem sido associada à ativação de gene *POMC*. Esta cascata de eventos causa redução no consumo e aumenta a utilização de energia orgânica para manutenção, crescimento e reprodução (Richards et al., 2010), portanto a ação oposta dessas duas vias (AMPK e mTOR), que causa mudanças no consumo de alimentos e no balanço energético, ações essas mediadas pelos neurônios orexígenos e anorexígenos (Richards et al., 2010), podem ser determinantes para alcançar o equilíbrio metabólico e o desenvolvimento animal. Nesse sentido, nosso resultado sugere mais uma possível explicação para o menor consumo de ração observado em fêmeas quando comparadas aos machos.

Assim como o *POMC*, a grelina também exerce influência anorexígena em aves, e estudos têm demonstrado que a injeção de grelina intracerebroventricular e periférica em frangos neonatais causa redução no consumo de ração (Furuse et al., 2001; Saito et al., 2005; Ocloñ e Pietras, 2011). Apesar de estudos mostrarem maior expressão do gene grelina (*GHRL*) no hipotálamo de animais submetidos ao estresse térmico crônico (Song et al., 2012), em nosso estudo, onde o período de avaliação foi de 24 horas, não observamos efeito de ambiente ou de sexo sobre a expressão deste gene. Por outro lado, Lei et al. (2013), avaliando aves em condição de estresse térmico agudo, também não observaram diferença na expressão do gene *GHRL* no hipotálamo, porém os mesmos encontraram maior nível de expressão para esse mesmo gene no proventrículo das aves,

sugerindo que a grelina oriunda desse tecido pode mediar o efeito anorexígeno induzido pelo estresse por calor.

Nossos resultados indicam que o consumo de ração é função de diversos fatores ainda desconhecidos, e nos permite sugerir que os genes hipotalâmicos avaliados nesse estudo podem estar envolvidos nas diferenças observadas no consumo voluntário de ração entre animais de diferentes sexos e expostos a diferentes condições ambientais, e que esse controle do consumo ocorre em função do balanço entre a ação de substâncias orexígenas, NPY e AMPK, e anorexígenas, como o POMC.

LITERATURA CITADA

- Al-Batshan, H. A., and E O. S. Hussein. 1999. Performance and carcass composition of broilers under heat stress: I. the effects of dietary energy and protein. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 12(Suppl. 6):9142-922. doi: <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.1999.914>
- Benyi, K., T. S. Tshilate, A. J. Netshipale, and K. T. Mahlako. 2015. Effects of genotype and sex on the growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Trop Anim Health Prod* 47(Suppl. 7):1225-1231. doi: 10.1007/s11250-015-0850-3
- Berrong, S. L., and K. W. Washburn. 1998. Effects of genetic variation on total plasma protein, body weight gains, and body temperature responses to heat stress. *Poult. Sci.* 77:379-385. doi: 10.1093/ps/77.3.379
- Bertechini, A. G. 2012. *Nutrição de monogástrico*. 2nd rev. ed. UFLA, Minas Gerais.
- Bchini-Hoof van Huijsduijnen OB, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid levels in pre-obese and genetically obese (fa/fa) rats; potential regulation thereof by corticotropin-releasing factor. *J. Neuroendocrinol.* 1993; 5: 381-386. PMID: 8401561
- Bicknell, A. B. 2008. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J. Neuroendocrinol.* 20(Suppl. 6):692-699. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01709.x
- Boswell, T., I. C. Dunn, and S. A. Corr. 1999. Hypothalamic neuropeptide Y mRNA is increased after feed restriction in growing broilers. *Poult. Sci.* 78:1203-1207. doi: 10.1093/ps/78.8.1203
- Boudeau, J., A. F. Baas, M. Deak, N. A. Morrice, A. Kieloch, M. Schutkowski, A. R. Prescott, H. C. Clevers, and D. R. Alessi. 2003. MO25 α/β interact with STRAD α/β enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* 22(Suppl. 19):5102-5114. doi: 10.1093/emboj/cdg490
- Braz, J. R. C. 2005. Fisiologia da termorregulação normal. *Revista Neurociências* 13(Suppl. 3):12-17.
- Brobeck, J. R. 1948. Food intake as a mechanism of temperature regulation. *Yale J Biol Med* 20(Suppl. 6):545-552.
- Buyse, J., S. Janssen, S. Geelissen, Q. Swennen, H. Kaiya, V. M. Darras, and S. Dridi. 2009. Ghrelin modulates fatty acid synthase and related transcription factor mRNA levels in a tissue-specific manner in neonatal broiler chicks. *Peptides* 30(Suppl. 7):1342-1347. doi: 10.1016/j.peptides.2009.04.015

- Cheng, T. K., M. L. Hamre, and C. N. Coon. 1997. Effect of environmental and energy levels on temperature, dietary protein, broiler performance. *J. Appl. Poultry Res.* 6:1-17.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschöp, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone, and T. L. Horvath. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661. doi:10.1016/S0896-6273(03)00063-1
- Eva, C., M. Serra, P. Mele, Gi.Panzica, and A. Oberto. 2006. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol* 27:308-339.
- Ferket, P. R., and A. G. Gernat. 2006. Factors that affect feed intake of meat birds: a review. *Int. J. Poult. Sci.* 5(10):905-911. doi: 10.3923/ijps.2006.905.911
- Ferrini, F., C. Salio, L. Lossi, and A. Merighia. 2009. Ghrelin in central neurons. *Curr Neuropharmacol* 7(Suppl. 1):37-49. doi: 10.2174/157015909787602779
- Furuse, M., T. Tachibana, A. Ohgushi, R. Ando, T. Yoshimatsu, and D. M. Denbow. 2001. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett.* 301:123-126.
- Hardie, D. G. 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144(Suppl. 12):5179-5183. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0982>
- Hardie, D. G. 2007. AMPK and SNF1: snuffing out stress. *Cell Metab.* 6(Suppl. 5): 339-340. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.001
- Ito, K., M. A. Bahry, Y. Hui, M. Furuse, and V. S. Chowdhury. 2015. Acute heat stress up-regulates neuropeptide Y precursor mRNA expression and alters brain and plasma concentrations of free amino acids in chicks. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 187:13-19. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.04.010
- Kinzeler, N. R., and K. S. Edwards. 2009. Functional implications for modulating neuropeptide Y gene expression in the dorsomedial hypothalamus. *J. Neurosci.* 29(23):7389-7391. doi:10.1523/JNEUROSCI.1647-09.2009
- Korbonits, M., S. A. Bustin, M. Kojima, S. Jordan, E. F. Adams, D. G. Lowe, K. Kangawa, and A. B. Grossman. 2000. The Expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(Suppl. 2):881-887. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.2.7190>
- Kuo, A. Yi-Wen. 2003. Genomic and physiological differences for ghrelin and leptin receptor in lines of chickens selected for high and low body weight. PhD Diss. Faculty of Virginia Polytechnic - Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Lee, K., B. Li, X. Xi, Y. Suh, and R. J. Martin. 2005. Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* 146(Suppl. 1):3-10. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0968>
- Lei, L., and Z. Lixian. 2012. Effect of 24 h fasting on gene expression of AMPK, appetite regulation peptides and lipometabolism related factors in the hypothalamus of broiler chicks. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 25(Suppl. 9):1300-1308. doi: 10.5713/ajas.2012.12153
- Lei, L., L. Hepeng, L. Xianlei, J. Hongchao, L. Hai, A. Sheikahmadi, W. Yufeng, e S. Zhigang. 2013. Effects of acute heat stress on gene expression of brain-gut

- neuropeptides in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 91:5194-5201. doi: 10.2527/jas.2013-6538
- Lin, H., E. Decuyper, and J. Buyse. 2004. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) 2. Short-term effect. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 139:745-751.
- MacNeil, D. J., A. D. Howard, X. Guan, T. M. Fong, R. P. Nargund, M. A. Bednarek, M. T. Goulet, D. H. Weinberg, A. M. Strack, D. J. Marsh, H. Y. Chen, Chun-Pyn Shen, A. S. Chen, C. I. Rosenblum, T. MacNeil, M. Tota, E. D. MacIntyre, and L. H.T. Van der Ploeg. 2002. The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 450(Suppl. 1):93-109. doi: 10.1016/S0014-2999(02)01425-5
- Merckaert, J., and F. Vandesaende, 1996. Autoradiographic localization of receptors for neuropeptide Y (NPY) in the brain of broiler and leghorn chickens (*Gallus domesticus*). *J. Chem. Neuroanat.* 12:123-134.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Young-Bum Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fougelle, P. Ferré, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck, and B. B. Kahn. 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 48:569-574. doi:10.1038/nature02440
- Minokoshi, Y., T. Shiuchi, S. Lee, A. Suzuki, and S. Okamoto. 2008. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition* 24:786-790. doi: 10.1016/j.nut.2008.06.002.
- Minor, R. K., J. W. Chang, and R. Cabo. 2009. Hungry for Life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299(Suppl. 1):79-88. doi: 10.1016/j.mce.2008.10.044
- Mitchell, M. A., and A. J. Carlisle. 1992. The effect of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gullus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 101A:137-142.
- Mujahid, A., Y. Yoshiki, Y. Akiba, and M. Toyomizu. 2005. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poult. Sci.* 84:307-314. doi: 10.1093/ps/84.2.307
- Mujahid, A., Y. Akiba, and M. Toyomizu. 2007. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poult. Sci.* 86(Suppl. 2):364-371. doi: 10.1093/ps/86.2.364
- Murphy, K. G., and S. R. Bloom. 2004. Gut hormones in the control of appetite. *Exp. Physiol.* 89(Suppl. 5):507-516. doi: 10.1113/expphysiol.2004.027789
- Ocloñ, E., e M. Pietras. 2011. Peripheral ghrelin inhibits feed intake through hypothalamo-pituitary-adrenal axis-dependent mechanism in chicken. *J. Anim. Feed Sci.* 20:118-130.
- Oliveira, R. F. M., J. L. Donzele, M. L. T. Abreu, R. A. Ferreira, R. G. M. V. Vaz, and P. S. Cella. 2006. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. *Revista Bras. Zootec.* 35:797-803. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982006000300023>
- Oliveira, W. P., R. F. M. OliveiraI, J. L. Donzele, A. R. O. Neto, P. C. Gomes, A. P. A. Maia, P. H. R. F. Campos, and E. Gasparino. 2013. Dietary crude protein reduction on growth and carcass performance of 22 to 42-day-old broilers reared under different temperatures. *R. Bras. Zootec.* 42(Suppl. 8):599-604. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982013000800010>

- Proszkowiec-Weglarz, M., M. P. Richards, R. Ramachandran, and J. P. McMurtry. 2006. Characterization of the AMP-activated protein kinase pathway in chickens. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 143:92-106.
- Quinteiro-Filho, W. M., A. Ribeiro, V. F. Paula, M. L. Pinheiro, M. Sakai, L. R. M. Sá, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo-Neto. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89(Suppl. 9):1905-1914. doi: 10.3382/ps.2010-00812
- Quinteiro-Filho, W. M., M. V. Rodrigues, A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, M. L. Pinheiro, L. R. M. Sá, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo-Neto. 2012. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *J. Anim. Sci.* 2012.90:1986–1994 doi:10.2527/jas2011-3949
- Richards, M. P., S. M. Poch, and J. P. McMurtry. 2006. Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145(Suppl. 3):298-310.
- Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poult. Sci.* 86:1478-1490. doi: 10.1093/ps/86.7.1478
- Richards, M. P., R. W. Rosebrough, C. N. Coon, and J. P. McMurtry. 2010. Feed intake regulation for the female broiler breeder: In theory and in practice. *J. Appl. Poult. Res.* 19:182-193. doi: 10.3382/japr.2010-00167
- Rondelli, S. I., O. I. Martinez, and P. T. García. 2003. Sex effect on productive parameters, carcass and body fat composition of two commercial broilers lines. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 5(Suppl. 3):169-173.
- Ropelle, E. R., J. R. Pauli, K. G. Zecchin, M. Ueno, C. T. Souza, J. Morari, M. C. Faria, L. A. Velloso, M. J. A. Saad, and J. B. C. Carvalheira. 2007. A central role for neuronal adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. *Endocrinology* 148(11):5220-5229.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, and S. L. T. Barreto. 2011. Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. 3th. ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Saito, Ei-Suke., H. Kaiya, T. Tachibana, S. Tomonaga, D. Denbow, K. Kangawa, and M. Furuse. 2005. Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotropin-releasing factor system in neonatal chicks. *Regul. Pept.* 125:201-208.
- Sands, J. S., and M. O. Smith. 1999. Broilers in heat stress conditions: effects of dietary manganese proteinate or chromium picolinate supplementation. *J. Appl. Poultry Res.* 8:280-287.
- Schauer, E., F. Trautinger, A. Köck, A. Schwarz, R. Bhardwaj, M. Simon, J. C. Ansel, T. Schwarz, and T. A. Luger. 1994. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 93(Suppl. 5):2258-2262.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, D. Vasquez, Seung-Hoi Koo, N. Bardeesy, R. A. DePinho, M. Montminy, and L. C. Cantley. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005. 310(Suppl. 5754):1642-1646.
- Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2001. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic

- peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-232.
- Simpson, K. A., N. M. Martin, and S. R. Bloom. 2009. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(Suppl. 2):120-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000200002>
- Smith, M. O. 1993. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. *Poult. Sci.* 72:1146-1150.
- Song, Z., L. Liu, A. Sheikahmadi, H. Jiao, and H. Lin. 2012. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/484869>
- Stein, S. C., A. Woods, N. A. Jones, M. D. Davison, and D. Carling. 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* 345:437-43.
- Strader, A. D., H. B. Schiöth, and J. D. Buntin. 2003. The role of the melanocortin system and the melanocortin-4 receptor in ring dove (*Streptopelia risoria*) feeding behavior. *Brain Res.* 960:112-121.
- Stringhini, J. H., M. L. Andrade, L. Andrade, S. A. G. Xavier, M. B. Café, and N. S. M. Leandro. 2006. Desempenho, balanço e retenção de nutrientes e biometria dos órgãos digestivos de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de proteína na ração pré-inicial. *R. Bras. Zootec.* 35(Suppl. 6):2350-2358. doi: [10.1590/S1516-35982006000800022](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982006000800022)
- Tachibana, T., K. Sugahara, A. Ohgushi, R. Ando, S. Kawakami, T. Yoshimatsu, and M. Furuse. 2001. Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neurosci Lett.* 305:131-134.
- Towler, M. C., and D. G. Hardie. 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* 100:328-341. doi: [10.1161/01.RES.0000256090.42690.05](http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000256090.42690.05)
- Varela, L., and T. L. Horvath. 2012. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO rep.* 13:1079-1086. doi: [10.1038/embor.2012.174](http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.174)
- Woods, A., S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, e D. Carling. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 13(Suppl. 22):2004-2008. doi: [10.1016/j.cub.2003.10.031](http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031)
- Wren, A. M., C. J. Small, H. L. Ward, K. G. Murphy, C. L. Dakin, S. Taheri, A. R. Kennedy, G. H. Roberts, D. G. A. Morgan, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141(Suppl. 11):4325-4328.
- Yunianto, V., K. Hayashi, S. Kaneda, A. Ohtsuka, and Y. Tomita. 1997. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chicken. *Brit. J. Nut.*, 77:897-909.
- Xue, B., and B. B. Kahn. 2006. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J. Physiol.* 574.1:73-83. doi: [10.1113/jphysiol.2006.113217](http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.113217)

IV. EFEITOS DO SEXO E DA IDADE SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO EM FRANGOS DE CORTE

(Journal of Animal Science)

RESUMO- No presente estudo objetivamos avaliar se as diferenças observadas na deposição de gordura corporal entre os frangos de corte, machos e fêmeas, são influenciadas pelo efeito do sexo e da idade dos animais sobre a expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico. Para isso, frangos de corte machos e fêmeas, de 21 e 42 dias de idade, mantidos em ambiente de conforto térmico, foram alimentados com dietas formuladas para atender suas necessidades nutricionais. Observamos efeito da interação entre sexo e idade ($P=0,0451$) sobre o consumo de ração. Comparando aves de 42 dias de idade, observamos que machos apresentaram maior consumo. Com relação ao ganho de peso, observamos que machos e animais com 42 dias de idade apresentaram maior ganho de peso. Nós observamos efeito de interação entre sexo e idade sobre expressão dos genes acetil-CoAcarboxilase (*ACC*) ($P<0,0001$), ácido graxo sintase (*FAS*) ($P<0,0001$), adiponectina (*ADIPOQ*) ($P<0,0001$) e proteína quinase hepática B1 (*LKBI*) ($P=0,0232$). Fêmeas com 21 dias de idade apresentaram maior valor de expressão dos genes *ACC* e *LKBI*. Em relação ao gene *FAS*, maior nível de expressão foi observado em machos com 21 dias de idade. Para o gene *ADIPOQ*, encontramos maior expressão em fêmeas de 21 dias de idade. Não foi observada diferença entre a expressão nos machos com 21 dias e nas fêmeas de 42 dias de idade. Ambas as variáveis analisadas neste estudo mostraram efeito sobre a expressão dos genes proteína quinase ativada pelo AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) e apolipoproteína B (*APOB*). Maior expressão do gene *AMPK α -1* foi observada nos machos e em animais com 21 dias de idade. A respeito da expressão do gene *APOB*, observamos maior expressão em fêmeas e em frangos com 42 dias de idade. A expressão do gene apolipoproteína A-I (*APOA-1*) foi influenciada somente pela idade, sendo observado maior nível de expressão em animais com 21 dias de idade. Nossos resultados sugerem que o padrão de expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico pode sofrer efeitos do sexo e da idade dos animais, sugerindo que a maior deposição de gordura geralmente observada em fêmeas e em animais mais velhos pode decorrer em função da maior expressão de genes relacionados à síntese de lipídeos como a *ACC*, *FAS* e *APOB*. Adicionalmente, nossos resultados nos permitem sugerir

que animais que necessitam de maior aporte energético, devido à maior taxa metabólica, podem lançar mão de rotas relacionadas à oxidação lipídica por meio da maior expressão dos genes *LKB1*, *AMPK α -1*, e *APOA-I*.

Palavras-chave: metabolismo lipídico, sexo, idade, ácido graxo sintase, apolipoproteínas

INTRODUÇÃO

O maior teor de gordura corporal em frangos tem sido assunto de grande interesse, por estar relacionado à redução no rendimento de carcaça, e na aceitação do consumidor pelo produto (Emmerson, 1997). O acúmulo de gordura corporal é resultado da absorção, síntese e oxidação de lipídeos (Smink et al., 2010) que são determinados pelo balanço entre a lipogênese, que ocorre em sua maior parte no fígado de aves, e a lipólise (β -oxidação), que ocorre nas mitocôndrias (Kersten, 2001).

A síntese de lipídeos é realizada pelas enzimas acetil-CoA-carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) (Harvey e Ferrier, 2012). A atividade da ACC pode ser influenciada por diversos fatores, como a disponibilidade de energia, o hormônio insulina, e pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que age fosforilando essa enzima e tornando-a inativa (Berg et al., 2012). A inativação da enzima ACC está relacionada ao predomínio do mecanismo de β -oxidação, que dessa maneira disponibiliza energia para o organismo (Zhou et al., 2001).

O processo de deposição de gordura corporal em frangos machos e fêmeas apresenta algumas diferenças, sendo que fêmeas apresentam maior taxa de deposição de gordura que machos (Silva, 2012; Fouad e El-Senousey, 2014) em função de diferenças metabólicas e hormonais (Tor et al., 2002; Tumová e Teimouri, 2010). Assim como o sexo, a idade dos frangos também pode influenciar na taxa de deposição de gordura, já que maior conteúdo de gordura na carcaça é observado em frangos mais velhos em relação às aves mais novas (Zerehdaran et al., 2005; Nikolova et al., 2007).

O transporte de lipídeos pelo organismo é realizado por meio de lipoproteínas, que contém em sua estrutura, além de lipídeos, apolipoproteínas (Ginsberg, 1998). A apolipoproteína A-I (apoA-I) é o principal componente proteico, presente nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Fielding e Fielding, 1995), desempenhando, entre outras funções, o processo de transporte reverso do colesterol das células periféricas extra-hepáticas para o fígado, onde será metabolizado (Spady, 1999). Maiores níveis de HDL no plasma têm sido associados com a maior capacidade de

proteger o organismo contra a formação de placas aterogênicas, principalmente por realizar vital papel no transporte reverso do colesterol (Leança et al., 2010). Em frangos com baixa eficiência alimentar, a regulação negativa da expressão do gene *APOA-I* pode afetar a formação da HDL, prejudicando desse modo o processo de transporte reverso de colesterol a partir do tecido adiposo para o fígado (Zhuo et al., 2015). Esses autores sugerem ainda que a menor expressão do gene *APOA-I* pode resultar em maior acúmulo de gordura abdominal. Por outro lado, a apolipoproteína B (apoB) é o principal componente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Novak e Bydlowski, 1996). A LDL realiza o transporte de lipídeos do fígado para as células corporais (Nelson e Cox, 2011) e, segundo Couillard et al. (2002), a maior concentração de partículas lipoproteicas contendo apoB-48 e apoB-100 tem sido associada ao acúmulo de gordura abdominal. A maior expressão do gene *APOB* também tem sido relacionada com a deposição de gordura em frangos (Zhang e Shi, 2006).

Nesse sentido, o presente estudo foi desenvolvido sob a hipótese de que as diferenças observadas na deposição de gordura corporal entre os frangos de sexos e idades diferentes podem ocorrer em função de diferenças na expressão de genes relacionados ao metabolismo de síntese e de oxidação lipídica. Portanto, nosso objetivo foi avaliar o desempenho animal e a expressão dos genes acetil-CoA-carboxilase (*ACC*), ácido graxo sintase (*FAS*), proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*), proteína quinase hepática B1 (*LKB1*), adiponectina (*ADIPOQ*), apolipoproteína A-I (*APOA-I*) e apolipoproteína B (*APOB*), em frangos de corte machos e fêmeas, de 21 e 42 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido de acordo com as especificações do comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá.

Animais e Desenho experimental

Para realização do experimento, 60 fêmeas e 60 machos de frangos de corte (Cobb 500) (*Gallus gallus*) de 1 dia de idade foram utilizados. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2, tendo sido avaliados dois sexos, e duas idades de abate. Os animais foram separados por sexo em gaiolas coletivas (10 animais por gaiola), sendo estas as unidades experimentais para os dados de desempenho. As aves foram criadas

em sala climatizada em temperatura de conforto térmico (de acordo com o manual da linhagem Cobb) até os 21 dias de idade, quando 20 animais de cada sexo foram pesados e abatidos por deslocamento cervical. Os 80 animais restantes continuaram a ser criados de maneira convencional, em temperatura de conforto térmico até os 42 dias de idade, quando 20 animais de cada sexo foram pesados e abatidos por deslocamento cervical.

Durante o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e ração. A dieta foi balanceada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2011), e consistiu de uma ração baseada em milho e soja com 21,60% de proteína bruta e 3052 Kcal/Kg de energia, e 19,70% de proteína bruta e 3170 Kcal/Kg de energia, nas fases inicial e de crescimento, respectivamente.

Para calcular o ganho de peso, as aves foram pesadas com 1 dia de idade, com 21 dias e com 42 dias de idade. O ganho de peso da fase inicial foi calculado como (peso das aves aos 21 dias – peso das aves com 1 dia)/ número de aves; o ganho de peso da fase de crescimento foi calculado como (peso das aves aos 42 dias de idade – peso das aves aos 21 dias)/ número de aves.

O consumo de ração da fase inicial foi calculado como a diferença entre a quantidade de ração oferecida ao 1º dia de idade e as sobras ao final da fase experimental (21 dias). O consumo de ração da fase de crescimento foi calculado como a diferença entre a quantidade de ração oferecida no início da fase experimental (21 dias) e as sobras ao final do experimento (42 dias de idade). O consumo de ração e o ganho de peso foram corrigidos para a mortalidade.

Expressão Gênica

Para as análises de expressão gênica, amostras de fígado foram coletadas a partir de seis frangos machos e seis frangos fêmeas, com 21 e 42 dias de idade. Essas amostras foram conservadas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Previamente todo o material utilizado foi tratado com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O tecido foi triturado com homogenizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a sua completa dissociação. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados nas amostras, que foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas

por 15 minutos a 13482 x g, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um tubo limpo, adicionando em seguida 500 µL de isopropanol por tubo, e foi incubada a temperatura ambiente (25°C), por 10 minutos. Logo após, as amostras foram suavemente homogeneizadas, e centrifugadas por 10 minutos a 13482 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Mais uma vez o material foi centrifugado a 13482 x g por 5 minutos, e logo após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Por fim, deixamos o pelete secando por 15 minutos e em seguida foi ressuscitado em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 260 nm. E a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para esta reação, adicionamos em um tubo estéril e RNA free 1 µg de RNA total, 1 µL de 10 X DNase I reaction buffer e 1 µL DNase I amplification grade (1 U/µL). A reação foi então incubada à temperatura ambiente, por 15 minutos. Em seguida, inativamos a DNase I adicionando 1 µL de EDTA a 25 mM, e a reação foi aquecida a 65°C por 10 minutos. Essa etapa foi realizada para remoção de possível contaminação com DNA genômico.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizamos o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) e as reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Logo após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). Esse composto quando em solução apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR o acúmulo do corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta a formação dos amplicons, podendo desta forma ser detectada e quantificada.

Os primers utilizados nas reações de amplificação foram desenhados de acordo com Lei e Lixian (2012) e Jiang et al. (2014), com as sequências dos genes acetil-CoA-carboxilase (*ACC*), ácido graxo sintase (*FAS*), proteína quinase hepática B1 (*LKB1*), proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*), adiponectina (*ADIPOQ*), apolipoproteína A-I (*APOA-I*) e apolipoproteína B (*APOB*) depositados no

site www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso NM_205505, J03860, NM_001045833, DQ302133, AY523637, NM_205525 e M18421, respectivamente) (Tabela 1).

Foram testados dois controles endógenos, os genes da β -actina e do *GAPDH*, sendo utilizado o gene da β -actina (número de acesso L08165), por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 μ L e em duplicatas.

Tabela 1 - Sequências de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - RT-qPCR)

Gene	Amplicom (pb) ¹	Temperatura (°C) ²	Sequências dos Primers (5' - 3')	Autor
<i>ACC</i> ³	136	60°C	AATGGCAGCTTTGGAGGTGT TCTGTTTGGGTGGGAGGTG	Lei e Lixian, (2012)
<i>FAS</i>	107	60°C	CTATCGACACAGCCTGCTCCT CAGAATGTTGACCCCTCCTACC	Lei e Lixian, (2012)
<i>LKB1</i>	158	60°C	TGAGAGGGATGCTTGAATACGA ACTTGTCCTTTGTTTCTGGGC	Lei e Lixian, (2012)
<i>AMPKα-1</i>	266	60°C	CGGAGATAAACAGAAGCACGAG CGATTCAGGATCTTCACTGCAAC	Lei e Lixian, (2012)
<i>ADIPOQ</i>	86	60°C	GCCAGGTCTACAAGGTGTCA CCATGTGTCCTGGAAATCCT	Jiang et al., (2014)
<i>APOA-I</i>	217	60°C	GTGACCCTCGCTGTGCTCTT CACTCAGCGTGTCCAGGTTGT	Jiang et al., (2014)
<i>APOB</i>	196	60°C	GACTTGGTTACACGCCTCA TAACTTGCTGTTATGCTC	Jiang et al., (2014)
β -actina	136	60°C	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC	

¹Amplicon, Pares de base

²Temperatura de anelamento (°C)

³ACC, Acetil-CoA-carboxilase; FAS, Ácido graxo sintase; ADIPOQ, Adiponectina; LKB1, Proteína quinase hepática B1; AMPK α -1, Proteína quinase ativada por AMP subunidade catalica α -1; APOA-I, Apolipoproteína A-I; APOB, Apolipoproteína B. Adaptado de Lei e Lixian (2012) e Jiang et al., (2014).

Os primers analisados foram adequados para as reações de PCR em tempo real. As eficiências de amplificação foram semelhantes para todos os genes de interesse, com 90% a 110% de eficiência. As análises da curva de dissociação não revelaram qualquer produto inespecífico ou formação de dímeros de primers, o que demonstra a confiabilidade dos dados estimados nas expressões de mRNA dos genes avaliados. A β -actina utilizada como controle endógeno não mostrou nenhuma diferença significativa

entre as variáveis analisadas, o que confere eficiência a β -actina como controle endógeno.

Análise estatística

O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de expressão relativa e os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA). Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial inteiramente casualizado, tendo sido avaliado dois sexos (macho e fêmea), e duas idades (21 e 42 dias de idade). As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Desempenho

Os efeitos da idade e do sexo sobre o consumo de ração e ganho de peso são mostrados na Tabela 2. Observamos efeito da interação entre sexo e idade ($P = 0,0451$) sobre o consumo de ração. Comparando aves de 42 dias de idade, observamos que machos apresentaram maior consumo que fêmeas. Aos 21 dias, não houve diferença de consumo entre os sexos.

Observamos efeito significativo do sexo e da idade sobre o ganho de peso. Machos apresentaram maior ganho de peso do que fêmeas (1,27 Kg vs 0,95 Kg, respectivamente); e animais com 42 dias de idade apresentaram maior ganho em relação aos animais com 21 dias (1,48 Kg vs 0,74 Kg, respectivamente).

Tabela 2 - Consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) em frangos de corte machos e fêmeas de 21 e 42 dias de idade

		CR (Kg)		GP (Kg)	
		Média	DP	Média	DP
Macho	21 dias	0,92 ^c	0,03	0,83	0,05
	42 dias	2,54 ^a	0,41	1,72	0,28
Fêmea	21 dias	0,76 ^c	0,01	0,64	0,01
	42 dias	1,71 ^b	0,26	1,25	0,30
Efeitos principais					
Sexo	Macho	1,73	0,92	1,27 ^a	0,51
	Fêmea	1,24	0,54	0,95 ^b	0,38
Idade	21 dias	0,84	0,09	0,74 ^b	0,11
	42 dias	2,12	0,55	1,48 ^a	0,36
Probabilidades					
Sexo		0,0080		0,0239	
Idade		<0,0001		0,0002	
Interação		0,0451		0,2786	

^{a, b, c} Médias em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Expressão gênica

Na tabela 3 são apresentados os resultados da interação entre sexo e idade sobre a expressão dos genes acetil-CoA carboxilase (*ACC*), ácido graxo sintase (*FAS*), adiponectina (*ADIPOQ*) e proteína quinase hepática B1 (*LKBI*).

Fêmeas com 21 dias de idade apresentaram maior valor de expressão dos genes *ACC* (23,15 UA) e *LKBI* (1,87 UA). Em relação ao gene *FAS*, machos com 21 dias de idade apresentaram a maior expressão (12,04 UA), seguido pelas fêmeas com 42 dias (8,06 UA).

Maior expressão do gene da *ADIPOQ* foi observada em fêmeas de 21 dias de idade. Não foi observada diferença entre a expressão desse gene em machos com 21 dias e nas fêmeas de 42 dias de idade.

Tabela 3- Expressão dos genes *ACC*, *FAS*, *ADIPOQ* e *LKB1* no fígado de frangos de corte machos e fêmeas de 21 e 42 dias de idade

		<i>ACC</i> ¹		<i>FAS</i>		<i>ADIPOQ</i>		<i>LKB1</i> ²	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Macho	21 d	9,72 ^b	2,64	12,04 ^a	2,60	0,05 ^c	0,01	1,27 ^b	0,19
	42 d	5,79 ^b	1,42	1,44 ^c	0,93	0,09 ^b	0,03	1,12 ^b	0,46
Fêmea	21 d	23,15 ^a	7,92	1,74 ^c	0,15	0,17 ^a	0,02	1,87 ^a	0,24
	42 d	0,68 ^c	0,06	8,06 ^b	1,14	0,04 ^c	0,01	1,15 ^b	0,14
Efeitos principais									
Sexo	Macho	7,75	2,88	6,74	5,84	0,07	0,03	1,19	0,34
	Fêmea	11,91	12,89	4,90	3,39	0,11	0,07	1,51	0,42
Idade	21 d	16,44	8,99	6,89	5,66	0,11	0,07	1,57	0,38
	42 d	3,23	2,84	4,75	3,59	0,07	0,03	1,13	0,33
Probabilidades									
Sexo		0,0258		0,0069		0,0003		0,0129	
Idade		<0,0001		0,0022		<0,0001		0,0012	
Interação		<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,0232	

^{a, b, c} Médias em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ACC, Acetil-CoA-carboxilase; FAS, Ácido graxo sintase; ADIPOQ, Adiponectina; LKB1, proteína quinase hepática B1.

²Expresso como unidade arbitrária (UA).

Ambas as variáveis analisadas neste trabalho mostraram efeito sobre a expressão dos genes proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) e apolipoproteína B (*APOB*), como mostrado nas figuras 1 e 2, respectivamente. Podemos observar maior expressão do gene *AMPK α -1* nos machos em relação às fêmeas (1,17 vs 0,88 UA); e em animais com 21 dias de idade em relação aos de 42 dias (1,11 vs 0,95 UA).

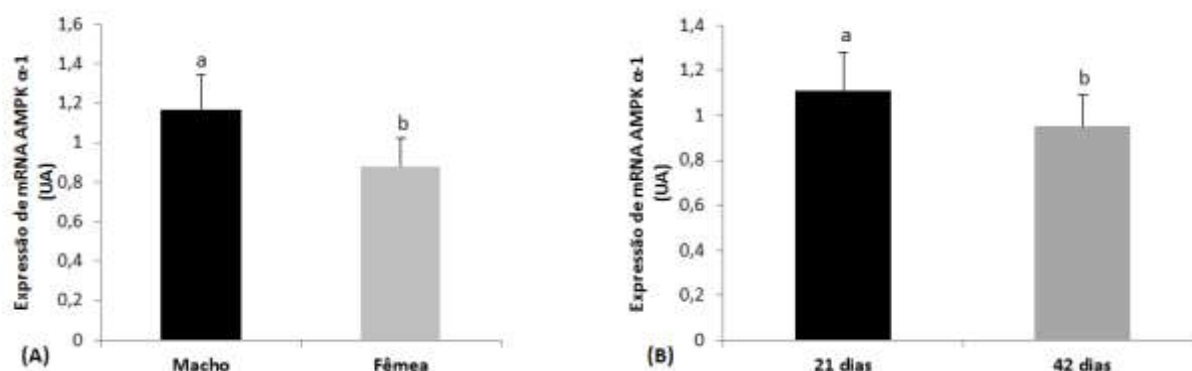


Figura 1 - Expressão do gene proteína quinase ativada por AMP subunidade catalítica α -1 (*AMPK α -1*) no fígado de machos e fêmeas (A) e em aves de 21 e 42 dias de idade (B). Expresso como unidade arbitrária (UA). Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A respeito da expressão do gene *APOB*, observamos maior expressão em fêmeas (274,19 UA), e em frangos com 42 dias de idade (515,43 UA).

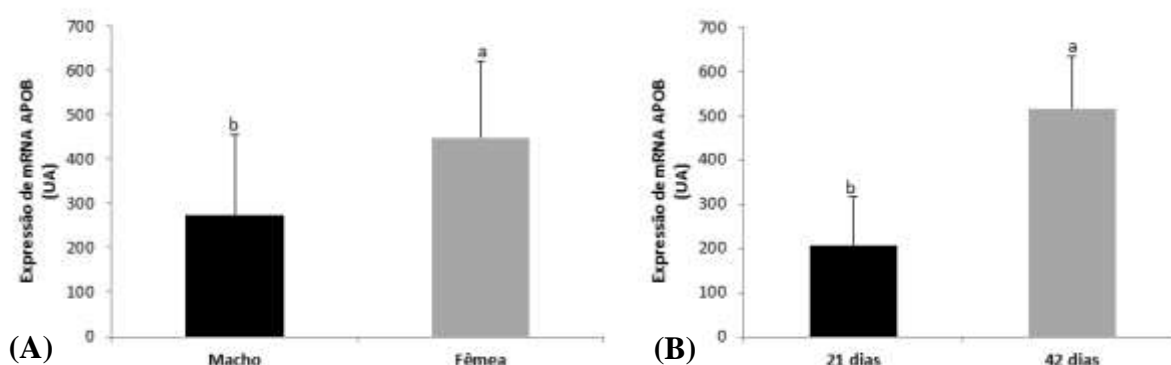


Figura 2 - Expressão do gene apolipoproteína B (*APOB*) no fígado de machos e fêmeas (A) e em aves de 21 e 42 dias de idade (B). Expresso como unidade arbitrária (UA). Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na figura 3, podemos observar que somente a idade teve efeito sobre a expressão do gene apolipoproteína A-I (*APOA-I*), sendo que animais com 21 dias de idade tiveram maior nível de expressão que animais com 42 dias (3988,20 vs 2259,53 UA, respectivamente).

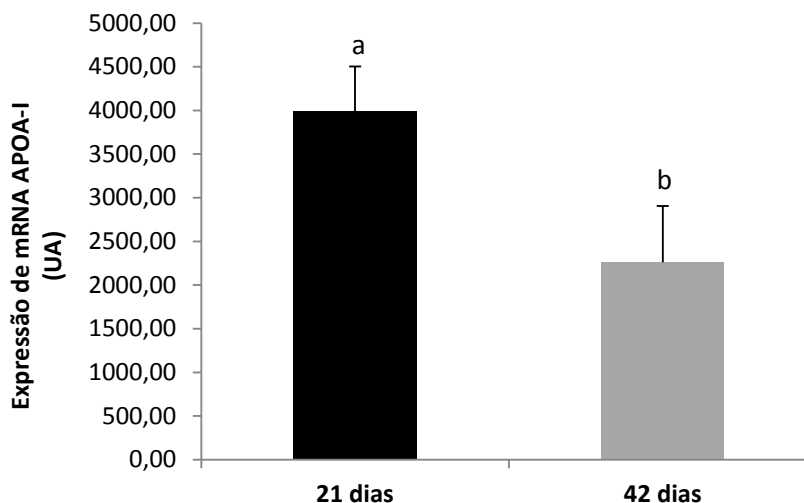


Figura 3 - Expressão do gene apolipoproteína A-I (*APOA-I*) em aves de 21 e 42 dias de idade. Expresso como unidade arbitrária (UA). Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Na produção animal, características de desempenho como o consumo de ração e ganho de peso são determinantes para a avaliação do crescimento animal. No presente estudo, observamos que machos de 42 dias de idade apresentaram maior consumo de ração e ganho de peso em relação às fêmeas e aos animais de 21 dias. Estes resultados podem ser explicados pela diferença nas necessidades nutricionais entre os sexos e as idades. Essas diferenças possivelmente estão relacionadas com a maior taxa de crescimento observada nos machos, que está relacionada com a maior capacidade de consumo de ração, e que reflete em maior ganho de peso (Bertechini, 2012).

O intenso processo de seleção genética em frangos permitiu que esses animais pudessem obter maior rendimento de carcaça em menor tempo de produção (Havenstein et al., 2003; Rekaya et al., 2013), entretanto, esse processo parece ter provocado também alterações fisiológicas relevantes durante o desenvolvimento dos animais, causando, entre outros fatores, aumento na deposição de gordura corporal das aves (Emmerson, 1997; Tumová e Teimouri, 2010). A gordura é um dos principais problemas enfrentados na indústria da carne de frango, podendo representar uma considerável fonte de perda no rendimento de carcaça e menor aceitação por parte dos consumidores (Gaya et al., 2006), além do fato de que grande parte dessa gordura não é fisiologicamente necessária (Choct et al., 2000).

A deposição de gordura corporal nos animais é resultado da absorção, síntese e oxidação de lipídeos (Smink et al., 2010) que são determinados pelo balanço entre a lipogênese e lipólise (β -oxidação) (Kersten, 2001). O processo de lipogênese compreende a síntese de ácidos graxos, e subsequentemente de triacilglicerol, ocorrendo no citoplasma das células do tecido adiposo e do fígado, em resposta a dietas ricas em energia (carboidratos) (Kersten, 2001). A síntese de lipídeos, que em aves ocorre predominantemente no fígado (Musa e Chen, 2007; Bertechini, 2012), também ocorre em função da disponibilidade de substratos lipídicos sintetizados nesse órgão (Hermier, 1997).

Após absorção, os lipídeos são transportados no organismo através de lipoproteínas que contêm em sua estrutura, além de lipídeos, apolipoproteínas como a apolipoproteína A-I (apoA-I), principal constituinte da fração proteica da lipoproteína de alta densidade (HDL) (Fielding e Fielding, 1995). A apoA-I desempenha importante função em associação com a HDL, como a realização do processo de transporte reverso do colesterol, das células periféricas extra-hepáticas para o fígado, onde é metabolizado

(Spady, 1999). Essa apolipoproteína pode ainda agir como um ligante para o transportador que promove o fluxo de colesterol livre das células (cassete ABCA-I) (Wang et al., 2000), e como cofator para a enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) (Parks et al., 1995), que catalisa a reação de esterificação do colesterol livre na lipoproteína HDL (Kunnen e Eck, 2012).

Diversos estudos têm mostrado que a idade dos animais é um fator que está intimamente relacionado à deposição de gordura na carcaça, sendo o maior teor de gordura corporal observada em frangos mais velhos em relação às aves mais novas (Zerehdaran et al., 2005; Nikolova et al., 2007; Silva, 2012). Em nosso estudo, observamos que frangos com 42 dias apresentaram menor expressão do gene *APOA-I* do que frangos com 21 dias de idade. Este resultado pode ajudar a explicar a maior deposição de gordura em aves mais velhas, já que, de acordo com Zhuo et al. (2015), a menor expressão do gene *APOA-I* pode afetar a formação da HDL, prejudicando desse modo o processo de transporte reverso de colesterol; dessa forma, esses autores sugerem que a menor expressão do gene *APOA-I* pode resultar em maior acúmulo de gordura abdominal.

Por outro lado, a apolipoproteína B (apoB), necessária para a síntese e secreção de quilomicrons e lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) (Ginsberg, 2002), desempenha, entre outras funções, importante papel na absorção e secreção de lipídeos (Cruz et al., 2015). Além disso, a apoB é o principal componente proteico da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Novak e Bydlowski, 1996), que realiza o transporte de lipídeos do fígado para as células corporais (Nelson e Cox, 2011). Em nosso trabalho, nós pudemos observar um maior nível de expressão do gene *APOB* em fêmeas e em animais com 42 dias de idade. Embora o mecanismo aprofundado que governa a deposição de gordura na carcaça não seja totalmente compreendido, nossos resultados sugerem que a maior expressão do gene *APOB* seria um dos possíveis contribuintes nesse processo para o maior teor de deposição de gordura corporal encontrado em fêmeas e aves de maior idade. Aparentemente, o acúmulo de gordura abdominal está associado com uma maior concentração de partículas lipoproteicas contendo apoB-48 e apoB-100 (Couillard et al., 2002).

O complexo enzimático multifuncional acetil-CoA-carboxilase (ACC) é um dos principais responsáveis pela biossíntese de lipídeos, catalisando uma etapa limitante dessa reação (Kim et al., 1989; Berg et al., 2012; Harvey e Ferrier, 2012). A transcrição da ACC pode ser influenciada por diversos fatores, entre os quais fatores nutricionais

(carboidratos e gordura) e hormonais, como a insulina, o glucagon e tri-iodotironina (Yin et al., 2000; Talukdar e Hillgartner, 2006). Nós observamos nesse estudo que fêmeas com 21 dias de idade apresentaram maior valor de expressão do gene ACC, e de acordo com Fischer e Goodridge (1978) as fêmeas apresentam maior conteúdo de mRNA da ACC no fígado quando comparadas aos machos, e o aumento da atividade enzimática da ACC tem início por volta do 19º dia de incubação e continua após o período de eclosão, independentemente do estado nutricional das aves. Esse maior nível de conteúdo enzimático pode ser atribuído à maior taxa de síntese da ACC (Fischer e Goodridge, 1978), bem como ao maior nível de mRNA da ACC em frangos em crescimento (Takai et al., 1988).

A síntese de lipídeos continua em uma sequência de reações repetitivas, que alonga a cadeia de ácido graxo em dois átomos de carbono, mediadas pela ação do sistema multienzimático ácido graxo sintase (FAS) (Harvey e Ferrier, 2012). De acordo com Back et al. (1986), o nível e a taxa de síntese da FAS está relacionado com a taxa de síntese de lipídeos no fígado dos animais em diferentes condições nutricionais e hormonais. No presente estudo, observamos efeito de interação entre sexo e idade sobre a expressão do gene ácido graxo sintase (FAS). Nas aves de 42 dias de idade, podemos verificar que fêmeas apresentaram maior expressão que machos e esse resultado está de acordo com Bertechini (2012), que sugere que as fêmeas a partir de 35 dias de idade depositam mais gordura na carcaça que machos. Durante o crescimento do animal, os hormônios que promovem o crescimento corporal serão substituídos por hormônios reprodutivos, causando mudança na composição do ganho de peso que, a partir desse ponto, se dará pelo acúmulo de gordura, portanto quanto maior for a idade de abate desses animais, maior será o teor de gordura na carcaça (Silva, 2012).

O hormônio adiponectina, por meio de ligação ao seu receptor (adipoR1 e adipoR2), promove a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Yamauchi et al., 2003), que por sua vez fosforila e inativa a enzima ACC. Esse hormônio ainda exerce influência sobre a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR α) (You et al., 2005; Kadowaki et al., 2006), que regula a expressão de genes relacionados à oxidação de lipídeos como a acil-CoA-graxo de cadeia longa sintetase (Wang et al., 2009). Esses mecanismos em conjunto estimulam a via de oxidação dos lipídeos, e promovem redução na síntese de lipídeos, na inibição da expressão do fator de transcrição proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP1c) com consequente inibição da expressão genes envolvidos no processo de

lipogênese, como a acetil-CoA-carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) (Wang et al., 2009), e esses efeitos causam redução na concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo (Fruebis et al., 2001; Tomas et al., 2002).

De acordo Sintubin et al. (2011), em frangos, a expressão do gene adiponectina (*ADIPOQ*) é maior em fêmeas do que em machos, e estudos sugerem que essa diferença observada parece ser em função de hormônios sexuais, como o estrógeno e a testosterona (Nishizawa et al., 2002; Xu et al., 2005). Além disso, Hendricks et al. (2009) demonstraram que frangos com oito semanas de idade apresentaram menor nível de adiponectina plasmática do que frangos com quatro semanas de idade. Os autores citam que além da idade, o aumento no conteúdo de gordura abdominal pode ter ocasionado declínio nos níveis de adiponectina circulante. E de acordo com esses autores, em nosso trabalho, também observamos maior expressão do gene adiponectina (*ADIPOQ*) em fêmeas mais jovens. Nesses mesmos animais, observamos também maior expressão do gene *ACC*, o que nos permite inferir que provavelmente exista um equilíbrio entre os processos de síntese e oxidação de lipídeos, prevenindo dessa maneira um acúmulo excessivo de gordura na carcaça.

No fígado, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) tem sido reconhecida como uma importante via capaz de regular o metabolismo lipídico, em virtude da sua ação sobre enzimas lipogênicas (Zhou et al., 2001). Sua ação promove redução no processo de lipogênese e aumento na oxidação de lipídeos (Winder e Hardie, 1999). A ativação da AMPK ocorre quando o nível de energia orgânica (ATP) se encontra reduzida, e essa ativação pode ocorrer em função da fosforilação do resíduo de treonina 172, presente na subunidade catalítica α da AMPK (Hawley et al., 2003). A proteína quinase hepática B1 (LKB1), caracterizada como um complexo heterotrimérico, é considerada como a principal via de ativação da AMPK, uma vez que sua deleção no fígado resultou na redução da fosforilação da AMPK (Shaw et al., 2005). Nossos resultados mostram que animais de 21 dias de idade apresentaram maior expressão dos genes *LKB1* e *AMPK α -1*. O aumento na expressão desses genes pode indicar que o organismo encontra-se com maior exigência de energia, necessitando assim ativar vias metabólicas capazes de produzir ATP mediadas pela ação da AMPK, como é o caso de aves de 21 dias que apresentaram maiores taxas metabólicas em relação às aves de 42 dias de idade.

Estes resultados em conjunto contribuem para caracterizar alguns dos mecanismos que diferenciam machos de fêmeas, e animais de 21 de animais de 42 dias no que se

refere ao metabolismo lipídico. A maior deposição de gordura, geralmente observada em fêmeas (Silva, 2012) e em animais mais velhos (Zerehdaran et al., 2005), pode decorrer em função da maior expressão de genes relacionados à síntese de lipídeos como a *ACC*, *FAS* e *APOB*. Nossos resultados também permitem sugerir que animais que necessitam de maior quantidade de energia devido à maior taxa metabólica podem lançar mão de rotas relacionadas à maior oxidação lipídica, por meio da maior expressão dos genes *LKBI*, *AMPK*, e *APOA-I*.

LITERATURA CITADA

- Back, D. W., M. J. Goldman, J. E. Fischl, R. S. Ochsler, and A. G. Goodridge. 1986. The fatty acid synthase gene in avian liver. Two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription. *J. Biol. Chem.* 261(Suppl. 9):4190-4197.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2012. *Bioquímica*. 6th rev. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Bertechini, A. G. 2012. *Nutrição de monogástrico*. 2nd rev ed. UFLA, Minas Gerais.
- Choct, M., A. Naylor, O. Hutton, and J. Nolan. 2000. Increasing efficiency of lean tissue composition in broiler chickens. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Publication N° 98/123.
- Couillard, C., N. Bergeron, A. Pascot, N. Alméras, J. Bergeron, A. Tremblay, D. Prud'homme, and Jean-Pierre Després. 2002. Evidence for impaired lipolysis in abdominally obese men: postprandial study of apolipoprotein B-48- and B-100-containing lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(Suppl. 2):311-318.
- Cruz, V. A. R., F. S. Schenkel, R. P. Savegnago, N. V. Grupioni, N. B. Stafuzza, M. Sargolzaei, A. M. G. Ibelli, J. O. Peixoto, M. C. Ledur, and D. P. Munari. 2015. Association of apolipoprotein B and adiponectin receptor 1 genes with carcass, bone integrity and performance traits in a paternal broiler line. *PLoS One* 10(Suppl. 8):e0136824. doi: 10.1371/journal.pone.0136824.
- Emmerson, D. A. 1997. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry. *Poult. Sci.* 76:1121-1125. doi: 10.1093/ps/76.8.1121
- Fielding, C. F., and P. E. Fielding. 1995. Molecular transport physiology of reverse cholesterol. *J. Lipid Res.* 36:211-228.
- Fischer, P. W. F., and A. G. Goodridge. 1978. Coordinate regulation of acetyl coenzyme A carboxylase and fatty acid synthetase in liver cells of the developing chick in vivo and in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 190(Suppl. 1):332-344. doi:10.1016/0003-9861(78)90283-7
- Fouad, A. M. and H. K. El-Senousey. 2014. Nutritional factors affecting abdominal fat deposition in poultry: a review. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 27(Suppl. 7):1057-1068. doi: 10.5713/ajas.2013.13702
- Fruebis, J., Tsu-Shuen Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. S. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain, and H. F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(Suppl. 4):2005-2010.

- Gaya, L. G., G. B. Mourão, and J. B. S. Ferraz. 2006. Aspectos genético-quantitativos de características de desempenho, carcaça e composição corporal em frangos. *Cienc Rural* 36(Suppl. 2):709-716. doi: doi.org/10.1590/S0103-84782006000200058
- Ginsberg, H. N. 1998. Lipoprotein physiology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27(Suppl. 3):503-519.
- Ginsberg, H. N. 2002. New perspectives on atherogenesis. Role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Circulation* 106: 2137-2142.
- Harvey, R. A., and D. R. Ferrier. 2012. *Bioquímica Ilustrada*. 5th rev ed. Artmed, Porto Alegre.
- Havenstein, G. B., P. R. Ferket, and M. A. Qureshi. 2003. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.* 82:1500-1508. doi: 10.1093/ps/82.10.1500
- Hawley, S. A., J. Boudeau, J. L. Reid, K. J. Mustard, L. Udd, T. P. Mäkelä, D. R. Alessi, and D. G. Hardie. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2(Suppl. 4):28.1-28.16.
- Hendricks, G. L., J. A. Hadley, S. M. Krzysik-Walker, K. S. Prabhu, R. Vasilatos-Younken, and R. Ramachandran. Unique profile of chicken adiponectin, a predominantly heavy molecular weight multimer, and relationship to visceral adiposity. *Endocrinology* 150(Suppl. 7):3092-3100. doi: 10.1210/en.2008-1558.
- Hermier, D., 1997. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J. Nutr.* 127(Suppl. 5):805S-808S.
- Jiang, R. R., G. P. Zhao, J. P. Zhao, J. L. Chen, M. Q. Zheng, R. R. Liu, and J. Wen. 2014. Influence of dietary nicotinic acid supplementation on lipid metabolism and related gene expression in two distinct broiler breeds of female chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 98(Suppl. 5):822-829. doi: 10.1111/jpn.12138
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin Invest.* 116(Suppl. 7):1784-1792. doi: 10.1172/JCI29126
- Kersten, S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2(Suppl. 4):282-286.
- Kim, K-H., F. Lopez-Casillas, D. H. Bai, X. Luo, and M. E. Pape. 1989. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* 3(Suppl. 11):2250-2256.
- Kunnen, S., and M. V. Eck. 2012. Lecithin-cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J. Lipid Res.* 53:(Suppl. 9):1783-1799. doi: 10.1194/jlr.R024513
- Leança, C. C., M. Passarelli, E. R. Nakandakare, and E. C. R. Quintão. 2010. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 54(Suppl. 9):777-784. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0004-2730201000090000
- Lei, L., and Z. Lixian. 2012. Effect of 24 h fasting on gene expression of AMPK, appetite regulation peptides and lipometabolism related factors in the hypothalamus of broiler chicks. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25(Suppl. 9):1300-1308. doi: 10.5713/ajas.2012.12153
- Musa, H. H., and G. H. Chen. 2007. Association of polymorphisms in avian apo VLDL-II gene with body weight and abdominal fat weight. *Afr. J. Biotechnol.* 6(Suppl. 17):2009-2013.
- Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2011. *Lehninger Principles of biochemistry*. 5th rev. ed. Worth Publishers, New York.

- Nikolova, N., Z. Pavlovski, N. Milošević, and L. Perić. 2007. The quantity of abdominal fat in broiler chicken of different genotypes from fifth to seventh week of age. *Biotechnology in Animal Husbandry* 23:331-338.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51(Suppl. 9):2734-2741.
- Novak, E. M., and S. P. Bydlowski. 1996. *Biologia molecular das dislipidemias. Variação genética das apolipoproteínas.* Arq. Bras. Cardiol. 67(Suppl. 6):411-417.
- Parks, J. S., H. Li, A. K. Gebre, T. L. Smith, and N. Maeda. 1995. Effect of apolipoprotein A-I deficiency on lecithin:cholesterol acyltransferase activation in mouse plasma. *J. Lipid Res.* 36:349-355.
- Rekaya, R., R. L. Sapp, T. Wing, and S. E. Aggrey. 2013. Genetic evaluation for growth, body composition, feed efficiency, and leg soundness. *Poult. Sci.* 92:923-929. doi: 10.3382/ps.2012-02649.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, and S. L. T. Barreto. 2011. *Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements.* 3th. ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, D. Vasquez, S-H. Koo, N. Bardeesy, R. A. DePinho, M. Montminy, and L. C. Cantley. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 310(Suppl. 5754):1642-1646.
- Silva, C. R. 2012. *Desempenho e deposição de nutrientes em frangos de corte alimentados com diferentes níveis dietéticos de lisina.* PhD Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
- Sintubin, P., E. Decuypere, J. Buyse, A. Gertler, R. Whitfield, and S. Dridi. 2011. Leptin and cerulenin differently regulate adiponectin gene expression in chicken liver and hypothalamus. *J Microb Biochem Technol* 3(Suppl. 5):067-072. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000054>
- Smink, W., W. J. J. Gerrits, R. Hovenier, M. J. H. Geelen, M. W. A. Verstegen, and A. C. Beynen. 2010. Effect of dietary fat sources on fatty acid deposition and lipid metabolism in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89:2432-2440. doi: 10.3382/ps.2010-00665
- Spady, D. K. 1999. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* 100:576-578. doi: 10.1161/01.CIR.100.6.576
- Takai, T., Y. Saito, K. Yamamoto, and T. Tanabe. 1988. Developmental changes of the content of acetyl-CoA carboxylase mRNA in chicken liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 266(Suppl. 2):313-318. doi:10.1016/0003-9861(88)90263-9
- Talukdar, S., and F. B. Hillgartner. 2006. The mechanism mediating the activation of acetyl- coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J. Lipid Res.* 47:2451-2461. doi: 10.1194/jlr.M600276-JLR200
- Tomas, E., Tsu-Shuen Tsao, A. K. Saha, H. E. Murrey, C. cheng. Zhang, S. I. Itani, H. F. Lodish, and N. B. Ruderman. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(Suppl. 25): 16309-16313. doi: 10.1073/pnas.222657499
- Tor, M., J. Estany, D. Villalba, E. Molina, e D. Cubiló. 2002. Comparison of carcass composition by parts and tissues between cocks and capons. *Anim. Res.* 51:421-431. doi: 10.1051/animres:2002035

- Tumová, E., and A. Teimouri. 2010. Fat deposition in the broiler chicken: a review. *Scientia Agriculturae Biohemica*. 41(Suppl. 2):121-128.
- Wang, N., D. L. Silver, P. Costet, and A. R. Tall. 2000. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J. Biol. Chem.* 275:33053-33058. doi: 275:33053-33058.
- Wang, Y., M. Zhou, K. S. L. Lam, and A. Xu. 2009. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Arq Bras Endocrinol Metab* 53(Suppl. 2):201-212. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000200012>
- Winder, W.W., and D. G. Hardie. 1999. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277(Suppl. 1):E1-E10.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizok, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunodaq, K. Murakamiq, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizuk, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423(Suppl. 6941):762-769. doi:10.1038/nature01705
- Yin, L., Y. Zhang, T. Charron, and F.B. Hillgartner. 2000. Thyroid hormone, glucagon, and medium-chain fatty acids regulate transcription initiated from promoter 1 and promoter 2 of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in chick embryo hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1517:91-99. doi:10.1016/S0167-4781(00)00267-0
- You, M., R. V. Considine, T. C. Leone, D. P. Kelly, and D. W. Crabb. 2005. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 42:568-577. doi: 10.1002/hep.20821
- Xu, A., K. W. Chan, R. L. C. Hoo, Y. Wang, K. C. B. Tan, J. Zhang, B. Chen, M. C. Lam, C. Tse, G. J. S. Cooper, and K. S. L. Lam. 2005. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280:18073-18080.
- Zerehdaran, S., A. L. J. Vereijken, J. A. M. van Arendonk, and E. H. van der Waaij. 2005. Effect of age and housing system on genetic parameters for broiler carcass traits. *Poult. Sci.* 84:833-838. doi: 10.1093/ps/84.6.833
- Zhang, S., H. Li, and H. Shi. 2006. Single marker and haplotype analysis of the chicken apolipoprotein b gene T123G and D9 500D9- polymorphism reveals association with body growth and obesity. *Poult. Sci.* 85(Suppl. 2):178-184.
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. F. Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and D. E. Moller. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108(Suppl. 8):1167-1174. doi:10.1172/JCI200113505
- Zhuo, Z., S. J. Lamont, W. R. Lee, and B. Abasht. 2015. RNA-seq analysis of abdominal fat reveals differences between modern commercial broiler chickens with high and low feed efficiencies. *PLoS ONE* 10(Supl. 8): e0135810. doi: 10.1371/journal.pone.0135810

V. METHIONINE IMPROVES CAPACITY OF BROILER RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS

(Animal Science Production)

Abstract – The aim of the study was to evaluate the effects of heat stress (HS) and methionine supplementation on the markers of stress, and the expression of the genes for superoxide dismutase (*SOD*), thioredoxin (*TRx*), thioredoxin reductase 1 (*TRxRI*), methionine sulfoxide reductase A (*MsrA*), and cathepsin L2 (*CSTL2*) in broilers aged 1-21 or 22-42 days. The broilers were divided into two treatments, one with the recommended level of methionine supplementation (MS) and one without methionine supplementation (MD). The animals were maintained at either a temperature of thermal comfort or under HS (38°C for 24 hours). *Starter period*: We observed effects from the interaction between the diet and the temperature on the gene expression of *TRxRI* ($P = 0.043$) and *MsrA* ($P = 0.0006$). Expression of these genes was higher in the HS animals that received the MS diet than that with the MD diet. *Grower period*: The expression of the *SOD*, *TRxRI* and *MsrA* genes, AST and CK activity, and creatinine content were influenced by both of the study variables ($P < 0.05$). In the HS animals, the expression of these genes, AST activity and creatinine content increased and CK activity decreased. In the animals on the MD diet, the gene expression and the AST and creatinine values were higher and the CK activity was lower than those for the birds on the MS diet. Highest ALT activity was observed in the HS animals on the MD diet ($P < .0001$). Our results indicated that under HS conditions, the supplementation with methionine mitigated the effects of the stress because the methionine contributed to the increased expression of the genes related to thioredoxin complex activity.

Keywords: antioxidant, broiler, heat stress, oxidative stress, thioredoxin

Introduction

The ambient temperature is one of the most diverse topics examined in the research on poultry production (Mujahid *et al.* 2005; Lin *et al.* 2006; Mujahid *et al.* 2006; Yang *et al.* 2010). When the temperature is above the thermal comfort zone, animals experience heat stress (HS), which causes many physiological and metabolic problems, including those that result in lower feed intake and reduced weight gain (Oliveira *et al.* 2006). Moreover, the effects of HS may also be related to oxidative stress (Mujahid *et al.* 2006), which is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the elimination of ROS caused by a deficiency in antioxidant mechanisms (Sies 1997). The reactive oxygen species are produced in typical aerobic metabolism (Halliwell 2007), with the most common forms being superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and the hydroxyl radical (OH^\cdot) (Ray *et al.* 2012).

Reactive oxygen species damage biomolecules such as DNA, proteins and lipids (Willemsen *et al.* 2011) and therefore are deleterious to the organism. One of the effects of HS that is common with oxidative stress is the alteration of the activity of some enzymes in the blood plasma, for example, a reduction in creatine kinase (CK) activity (Del Vesco *et al.* 2015; Melesse *et al.* 2011). Thus, to avoid further damage, the organism has several antioxidant defense mechanisms, which include enzymatic mechanisms such as those based on the actions of the enzyme superoxide dismutase (Aluwong *et al.* 2013), the glutathione systems (Mahmoud and Edens, 2003) and also nonenzymatic antioxidants (Birben *et al.* 2012).

The essential amino acid methionine is one of the antioxidant nutrients that act to mitigate the deleterious effects of ROS to cells (Levine *et al.* 1996). In addition to involvement in glutathione synthesis (Swennen *et al.* 2011; Németh *et al.* 2004), the amino acid methionine has a direct protective effect against oxidative stress (Levine *et al.* 2000; Moskovitz *et al.* 2001). When reacting with ROS, methionine is oxidized reversibly to methionine sulfoxide. The enzyme methionine sulfoxide reductase A (MsrA) then catalyzes the reduction reaction of methionine sulfoxide back to methionine (Weissbach *et al.* 2005). After the reduction, the methionine residues in proteins are available again for reactions with ROS. The process of reducing the methionine sulfoxide is dependent on the action of the enzyme thioredoxin (TRx). In this reaction, the thioredoxin is oxidized and then is reduced through the reactions catalyzed by thioredoxin reductase (TRxR1), with the energy provided by NADPH (Koháryová and Kollárová 2008). The coordinated and complex enzymatic cycle results

in the catalytic removal of reactive species of nitrogen and oxygen (reviewed by Luo and Levine 2009).

Therefore, this study was based on the assumption that HS would increase the production of ROS and that methionine supplementation would help to combat ROS to minimize the deleterious effects induced by HS. To test this hypothesis, we evaluated the effects of HS and methionine supplementation on the expression of the genes involved in the metabolism of ROS elimination (i.e., *SOD*, *TRx*, *TRxRI* and *MsrA*), on the expression of the gene for cathepsin L2 (*CSTL2*), and on the levels of stress markers in the blood plasma of broilers aged 1-21 or 22-42 days.

Materials and Methods

The guidelines of the Committee on Animal Care of the Universidade Estadual de Maringá, Brazil, were followed in the performance of this experiment.

Experimental Design and Animals

Experiment 1: Starter period, age 1-21 d

A total of 240 male broilers (Cobb 500) (*Gallus gallus*) were used in the starter period experiment. The experiment was a completely randomized factorial design, with 2 thermal environments (thermal comfort zone or heat stress at 38°C for 24 h) x 2 levels of methionine supplementation (without supplementation of methionine - MD or with supplementation of methionine at the recommended level – MS, (Rostagno *et al.* 2011)) (Table 1). The animals were distributed in the four treatments with four replicates (pens) per treatment, and each replicate contained 15 birds. Throughout the experimental period, the animals had free access to food and water.

All the animals were raised in a climate-controlled room in the thermal comfort zone (according to the Cobb guide) until 20 d of age, and then 120 animals (60 from each diet) were acutely stressed with heat at 38°C for 24 h. After 24 h, the animals from both groups (comfort zone and heat stress) were slaughtered by cervical dislocation at 21 d. Before slaughter, the rectal temperature was measured in both groups.

To calculate the weight gain of the broilers from the thermal comfort zone, animals were weighed on days 20 and 21 of the starter period. To calculate the weight gain of the animals under heat stress, the specimens were weighed at the beginning (day 20) and at the end of the stress period (day 21). The feed intake was calculated as the difference between the amounts of feed offered at day 20 and the feed residues at the

end of the trial (day 21) in both environments. The feed intake and the weight gain were corrected for mortality.

Experiment 2: Grower period, age 22-42 d

A total of 240 male broilers (Cobb 500) (*Gallus gallus*) were used for the grower period experiment. Animals were raised conventionally until 21 d and were fed a balanced diet based on the nutritional demands (Rostagno *et al.* 2011) (Table 1). After 21 d, the animals were divided how they were in the first experiment. All animals were raised in a climate-controlled room in the thermal comfort zone (according to Cobb guide) until 41 d of age, and then 120 animals (60 from each diet) were acutely stressed with heat at 38°C for 24 h. After 24 h, animals from both groups (comfort zone and heat stress) were slaughtered by cervical dislocation at 42 d. Before slaughter, the rectal temperature was measured in both groups.

To calculate the weight gain of the broilers in the thermal comfort zone, animals were weighed on days 41 and 42 of the grower period. To calculate the weight gain of the animals under heat stress, they were weighed at the beginning (day 41) and at the end of the stress period (day 42). The feed intake was calculated as the difference between the amounts of feed offered on day 41 and the feed residues at the end of the trial (day 42) for the broilers in both environments. The feed intake and the weight gain were corrected for mortality.

Table 1- Experimental diets centesimal composition (expressed as-fed basis)

Ingredients	Starter period		Grower period	
	MD ¹	MS	MD	MS
Corn 7.8% CP	550.75	542.20	600.00	591.85
Soy bean meal 46.0% CP	373.00	374.00	324.00	325.00
Soy oil	39.00	42.00	46.00	49.00
Salt	4.50	4.50	4.30	4.30
Calcareous 38%	11.60	11.60	9.30	9.25
Dicalcium phosphate 20%	15.25	15.30	10.65	10.70
Methionine hydroxy analogue	-	4.50	-	4.20
L- Lysine HCl 78%	1.55	1.55	1.55	1.55
L-Treonine 78%	0.35	0.35	0.20	0.20
Premix ²	4.00	4.00	4.00	4.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Composition analysis (%)				
CP	21.61	21.60	19.73	19.71
Lysine digestible	1.19	1.20	1.08	1.08
Met+Cis digestible	0.58	0.88	0.54	0.81
Treonine digestible	0.78	0.78	0.70	0.70
Tryptophane digestible	0.24	0.24	0.22	0.22
Valine digestible	0.92	0.92	0.84	0.84
Isoleucine digestible	0.86	0.86	0.77	0.77
Arginine digestible	1.38	1.38	1.24	1.24
Composition Calculated (%)				
Ca	0.88	0.88	0.68	0.68
P	0.45	0.45	0.35	0.35
Na	0.20	0.20	0.19	0.19
AME (kcal/kg)	3052.51	3052.24	3169.60	3170.48

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation; ²Supplied by kilogram of diet: retinyl-acetate, 3.44 mg; cholecalciferol, 50 µg; DL- α -tocopherol, 15 mg; thiamine, 1.63 mg; riboflavin, 4.9 mg; pyridoxine, 3.26 mg; cyanocobalamin, 12 µg; D-pantothenic acid, 9.8 mg; D-biotin, 0.1 mg; menadione, 2.4 mg; folic acid, 0.82 mg; niacinamide, 35 mg; selenium, 0.2 mg; iron, 35 mg; copper, 8 mg; manganese, 60 mg; zinc, 50 mg; I, 1 mg; choline, 650 mg; salinomycin, 60 mg; avilamycin, 5 mg; butyl hydroxy toluene, 80 mg. The digestibility coefficient suggested by Rostagno et al. (2011) was used to obtain digestible amino acids. AME: apparent metabolizable energy.

Plasma analyses

At the end of each trial period, simultaneous with the slaughter, the blood was collected from five animals per treatment for the analyses of the contents of homocysteine, uric acid and creatinine and the plasma activities of creatine kinase (CK), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST). Blood was collected

from the jugular vein into heparin tubes and was kept on ice. After centrifugation ($3.024 \times g$, 10 min, 4°C), plasma was collected and was stored at -20°C until further analyses. The plasma homocysteine content was determined with the ADVIA Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL) system using the chemiluminescence method with the kit 09087913 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL). The uric acid and the creatinine content and the ALT, AST, and creatine kinase activity analyses were performed based on colorimetric methods with the following kits: uric acid - MS 80022230171; creatinine-PP – MS 80022230066; ALT - MS 80022230086; AST – MS 80022230083; and CK-NAC-PP - MS 80022230088. The manufacturer's recommendations for the kits were followed (Gold Analisa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The enzymatic activity of ALT and AST in the samples were calculated based on the decrease in absorbance at 340 nm when NADH was converted to NAD^{+} . One unit (U) of creatine kinase activity was defined as the amount of enzyme required to convert 1 mmol of creatine into CrP/min at 37°C , pH 9.0.

Gene expression

For the analyses of gene expression levels, liver samples were collected from five animals from the four treatments for both the starter and the grower periods, which were stored in RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brazil) at -20°C until the total RNA extraction.

The total RNA was extracted using Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions (1 mL per 100 mg of tissue). All the materials used were previously treated with the RNase inhibitor RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The total RNA concentration was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 260 nm. The RNA integrity was analyzed using a 1% agarose gel that was stained with 10% ethidium bromide and that was visualized under ultraviolet light. The RNA samples were treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions to remove possible genomic DNA contamination.

A SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for the cDNA synthesis, according to the manufacturer's instructions. Samples were stored at -20°C until further use.

The real-time PCR reactions were performed using the fluorescent dye SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All the reactions were analyzed under the same conditions and were normalized to the ROX Reference Dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to correct for fluctuations in the readings caused by evaporation during the reaction.

The primers used in the *SOD*, *CTSL2*, *TRx*, *TRxRI*, and *MsrA* amplification reactions were designed based on the gene sequences deposited at www.ncbi.nlm.nih.gov (accession numbers: NM_205064.1, NM_001168009.1, NM_205453, NM_001030762.2, and XM_004935891, respectively) using the site www.idtdna.com (Table 2). Two endogenous controls β -actin and *GAPDH* were used, and β -actin (accession number L08165) was selected because the amplification of β -actin was more efficient. All the analyses were performed in duplicate, each one in a volume of 25 μ L.

Table 2- Primer sequences used for quantitative real-time polymerase chain reaction

Gene	Amplicom (bp)	Annealing Temperature (°C)	Primer sequence (5' - 3')
<i>SOD</i>	126	60°C	TGGACCTCGTTTAGCTTGTG ACACGGAAGAGCAAGTACAG
<i>CTSL2</i>	80	60°C	GAAGTCAGAAAGGAAGTACAGAGG CTCTCCAGTCAACAGATCGTG
<i>TRx</i>	78	60°C	AAGGTGCAGGAATTCTCTGG CATGGCGGGAGATTAGACTAG
<i>TRxRI</i>	149	60°C	TGAACAAAGAGCCATCCTGAC ACGCAGATAACATCCCCAATG
<i>MsrA</i>	76	60°C	ATGACCCGACACAAGGAATG TGGGAAAAGGTGTAGATGGC
β -actin	136	60°C	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

The primers for the analyzed genes were adequate for the real-time PCR analyses. The amplification efficiencies were similar for the genes of interest, with 90% to 110% efficiency. The analyses of the dissociation curves did not reveal any unspecified products or the formation of primer dimers, which demonstrated the reliability of the data in the estimated mRNA expressions of the evaluated genes. The β -actin used as the endogenous control did not show any statistically significant differences among the treatments, which verified the efficiency of β -actin as the endogenous control.

Statistical analyses

The statistical analyses were performed separately for each period. The $2^{-\Delta CT}$ method was used to analyze the relative expressions. The results are expressed as averages and standard deviations. The UNIVARIATE procedure was applied to evaluate the normality of the data. The experiment was a completely randomized factorial design, with 2 thermal environments (thermal comfort and heat stress) and 2 levels of methionine supplementation (MD and MS). The averages were compared using Tukey's tests ($P < 0.05$) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

Results

Performance

Regardless of the experimental period (1-21 or 22-42 days of age), we observed that the acute heat stress (38°C for 24 hours) increased the body temperatures of the birds: 40.42°C ± 0.62 (thermal comfort) vs. 41.78°C ± 0.35 (HS) ($P < 0.0001$) for the animals in the starter period and 41.31°C ± 0.63 vs. 42.44°C ± 0.58 ($P < 0.0001$) for the animals in the grower period.

The weight gain (WG), the feed intake (FI), and the proportional weights of the liver, heart, abdominal fat, breast and legs of the animals from the starter and the grower periods are shown in Tables 3 and 4, respectively.

The animals exposed to HS from the starter period had lower weight gain ($P < 0.0001$) and lower feed intake ($P < 0.0001$). For the methionine supplementation, the animals on the MS diet had a higher abdominal fat content than that of the animals fed the MD diet ($P = 0.0120$).

The animals from the grower period in the thermal comfort zone had higher weight gain ($P = 0.0004$) and abdominal fat content ($P = 0.0048$) than those of the HS-treated animals. For the methionine supplementation, the lowest abdominal fat content and the highest proportional weight of the breast were observed in the animals that were fed the MS diet. We also observed an environment x diet interaction effect on the feed intake ($P = 0.0400$); the animals that remained in the thermal comfort zone and that were fed the MS diet had the highest feed intake. In the HS environment, the differences between the MD and the MS diets were not significant.

Table 3- Weight gain (WG), feed intake (FI), and proportional weight of organs and cuts of broilers from the starter period

		WG		FI		Proportional weight (%)									
						Breast		Legs		Liver		Heart		Abdominal fat	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	MD ¹	0.04	0.01	0.09	0.01	21.05	1.57	21.21	0.66	2.49	0.32	0.52	0.13	1.10	0.26
	MS	0.04	0.01	0.08	0.01	23.18	1.48	20.48	1.14	2.35	0.22	0.48	0.08	1.34	0.24
Stress	MD	0.01	0.01	0.07	0.01	22.96	0.44	20.50	0.77	2.15	0.17	0.40	0.03	1.08	0.30
	MS	0.02	0.01	0.06	0.01	23.97	0.91	20.00	1.79	2.35	0.46	0.46	0.08	1.81	0.32
Main effects															
Environment	Comfort	0.04 ^a	0.01	0.09 ^a	0.01	22.12	1.81	20.85	0.94	2.42	0.27	0.50	0.10	1.22	0.27
	Stress	0.01 ^b	0.01	0.07 ^b	0.01	23.47	0.85	20.25	1.26	2.25	0.33	0.43	0.06	1.44	0.49
Diet	MD	0.03	0.01	0.08	0.01	21.87 ^b	1.53	20.91	0.75	2.34	0.31	0.47	0.11	1.09 ^b	0.25
	MS	0.03	0.02	0.07	0.01	23.52 ^a	1.25	20.28	1.34	2.35	0.31	0.47	0.07	1.54 ^a	0.36
Probabilities															
Environment		<.0001		<.0001		0.0764		0.3560		0.3299		0.2153		0.1611	
Diet		0.0633		0.1584		0.0350		0.3224		0.9629		0.9848		0.0120	
Interaction		0.3301		0.5654		0.4339		0.8569		0.3163		0.3159		0.1275	

^{a, b} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05).

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

Table 4- Weight gain (WG), feed intake (FI), and proportional weight of organs and cuts of broilers from the grower period

		Proportional weight (%)													
		WG		FI		Breast		Legs		Liver		Heart		Abdominal fat	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	MD ¹	0.08	0.01	0.13 ^b	0.02	28.87	0.85	21.89	1.54	1.52	0.06	0.33	0.05	2.13	0.45
	MS	0.08	0.01	0.15 ^a	0.01	30.46	2.38	20.25	1.14	1.48	0.25	0.36	0.09	1.74	0.12
Stress	MD	-0.34	0.26	0.07 ^c	0.01	27.30	1.60	23.31	0.05	1.40	0.23	0.31	0.05	1.76	0.09
	MS	-0.16	0.06	0.07 ^c	0.01	30.39	1.85	21.26	0.61	1.50	0.07	0.35	0.02	1.09	0.11
Main effects															
Environment	Comfort	0.08 ^a	0.01	0.14	0.02	29.67	1.86	21.07	1.53	1.50	0.17	0.34	0.07	1.94 ^a	0.37
	Stress	-0.25 ^b	0.20	0.07	0.01	28.85	2.29	22.28	1.19	1.45	0.16	0.33	0.04	1.42 ^b	0.38
Diet	MD	-0.13	0.28	0.10	0.03	28.20 ^b	1.39	22.50	1.33	1.47	0.15	0.32	0.05	1.97 ^a	0.38
	MS	-0.04	0.13	0.11	0.04	30.43 ^a	2.00	20.68	1.03	1.49	0.18	0.35	0.06	1.46 ^b	0.36
Probabilities															
Environment		0.0004		<.0001		0.4105		0.0647		0.6492		0.6297		0.0048	
Diet		0.1988		0.1964		0.0397		0.1107		0.8248		0.2875		0.0043	
Interaction		0.2086		0.0400		0.4517		0.7346		0.4881		0.8525		0.3458	

^{a, b, c} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05).

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

Gene expression

The gene expression levels in the birds from the starter period for the two diets and the two environments are shown in Table 5. The gene expression levels of *TRxRI* ($P = 0.0403$) and *MsrA* ($P = 0.0006$) in the liver were influenced by the interaction between the temperature and the diet. The animals that experienced heat stress with the MS diet had the highest expression levels of the *TRxRI* (7.51 AU) and the *MsrA* (0.12 AU) genes, and the values were lower in the animals that remained in the thermal comfort zone on the MD diet.

The gene expression of *SOD* was influenced by both methionine supplementation ($P < 0.0001$) and heat stress ($P < 0.0001$). The *SOD* gene expression levels were higher in the animals that received the MS diet than in the animals on the MD diet, and the levels were higher in the HS animals than in the animals maintained in the thermal comfort zone.

Table 5- *SOD*, *CTSL2*, *TRx*, *TRxR 1*, and *MsrA* gene expression in the liver of broilers from the starter

		<i>SOD</i>		<i>CTSL2</i>		<i>TRx</i>		<i>TRxRI</i>		<i>MsrA</i> ²	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	MD ¹	4.92	1.26	0.33	0.07	4.13	2.58	0.62 ^c	0.24	0.05 ^c	0.01
	MS	9.28	0.56	0.36	0.08	2.24	1.73	0.74 ^{bc}	0.40	0.07 ^b	0.01
Stress	MD	8.51	1.58	0.35	0.08	2.96	1.11	3.35 ^b	0.85	0.06 ^{bc}	0.01
	MS	11.71	1.28	0.57	0.31	2.57	1.74	7.51 ^a	4.41	0.12 ^a	0.02
Main effects											
Environment	Comfort	7.10 ^b	2.46	0.35	0.07	3.19	2.32	0.68	0.32	0.06	0.01
	Stress	10.11 ^a	2.16	0.46	0.24	2.77	1.41	5.43	3.72	0.09	0.04
Diet	MD	6.71 ^b	2.32	0.34	0.07	3.54	1.99	1.98	1.54	0.05	0.01
	MS	10.50 ^a	1.58	0.47	0.24	2.41	1.67	4.13	4.63	0.10	0.03
Probabilities											
Environment		<.0001		0.1057		0.5891		<.0001		<.0001	
Diet		<.0001		0.0737		0.1509		0.0306		<.0001	
Interaction		0.2599		0.1934		0.3342		0.0403		0.0006	

^{a, b, c} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

²Expressed as arbitrary unity (AU).

In the grower phase, the effect of the interaction between diet and temperature was not significant for the expression of any of the genes (Table 6). However, the expression of the *SOD*, *TRxRI* and *MsrA* genes was influenced by both study variables. The

expression of these genes increased in the HS animals compared with the animals in the thermal comfort zone. For the methionine supplementation, the animals on the MS diet had higher levels of expression than those of the birds on the MD diet.

Table 6- *SOD*, *CTSL2*, *TRx*, *TRxR 1*, and *MsrA* gene expression in the liver of broilers from the grower period

		<i>SOD</i>		<i>CTSL2</i>		<i>TRx</i>		<i>TRxR1</i>		<i>MsrA</i> ²	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	MD ¹	8.67	2.13	0.52	0.28	3.73	2.22	0.80	0.19	0.08	0.05
	MS	11.21	3.87	0.56	0.21	2.49	1.42	1.10	0.44	0.10	0.01
Stress	MD	12.73	1.63	0.52	0.15	2.41	0.20	1.42	0.33	0.10	0.01
	MS	15.33	1.13	0.48	0.29	2.58	0.51	2.18	1.06	0.16	0.05
Main effects											
Environment	Comfort	9.94 ^b	3.26	0.54	0.24	3.11	1.89	0.95 ^b	0.36	0.09 ^b	0.04
	Stress	14.03 ^a	1.91	0.50	0.22	2.50	0.38	1.80 ^a	0.85	0.13 ^a	0.05
Diet	MD	10.70 ^b	2.79	0.52	0.21	3.07	1.65	1.11 ^b	0.42	0.09 ^b	0.04
	MS	13.27 ^a	3.47	0.52	0.24	2.54	1.02	1.64 ^a	0.96	0.13 ^a	0.04
Probabilities											
Environment		0.0005		0.6502		0.2761		0.0026		0.0307	
Diet		0.0172		0.9966		0.3411		0.0437		0.0140	
Interaction		0.9763		0.6878		0.2147		0.3719		0.1841	

^{a, b} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

²Expressed as arbitrary unity (AU).

Plasma analyses

The thermal environment was the only influence on the homocysteine content in the animals in the starter ($P = 0.0071$) and the grower phases ($P = 0.0046$). The HS-treated animals from both phases had lower contents of homocysteine than those of the birds that remained at the thermal comfort temperature (117.37 vs. 184.88 and 126.15 vs. 194.38, respectively; Fig. 1).

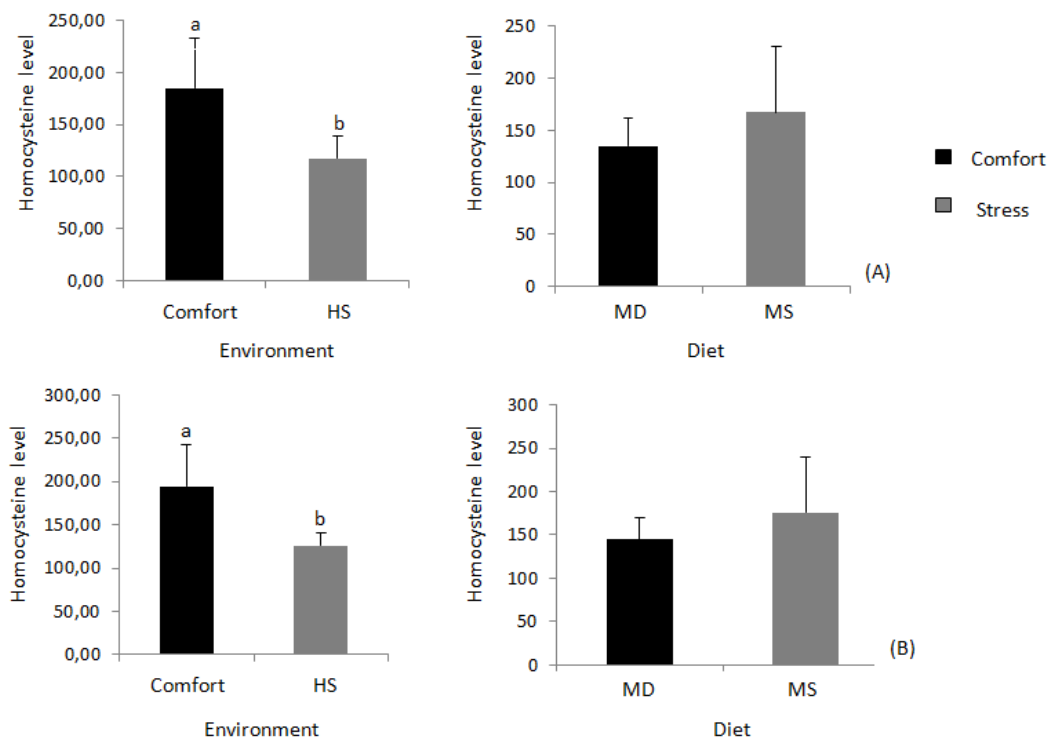


Fig. 1. Methionine supplementation and environment effects on plasma homocysteine content of birds from the starter (A) and grower (B) period. The results are expressed as $\mu\text{mol/L}$. The results are shown as the average, and the standard deviation is represented by the vertical bars. The different letters between the treatment groups represent a significant difference ($P < 0.05$). HS, heat stress; MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

The effects of methionine supplementation and high temperature on the plasma analyses from the starter period are shown in Table 7.

An effect of the interaction between the two factors on the creatinine content ($P = 0.0042$) and ALT activity ($P < 0.0001$) was observed. The highest value of creatinine was observed in the animals that were maintained in the thermal comfort zone and fed the MD diet (0.88 mg/dL). The highest value of ALT activity was found in the animals that experienced heat stress with the MD diet (24.67 U/L), and the lowest values were found in animals that remained at the thermal comfort temperature, independent of the diet.

We observed an effect of the thermal environmental on CK activity ($P < 0.0001$), with lower activity found in the HS animals than in those without the heat stress. Additionally, methionine supplementation ($P = 0.0449$) and thermal environment ($P < 0.0001$) affected the uric acid content, with the highest values occurring in the animals on the MS diet and in the animals in the thermal comfort zone.

The treatments did not affect the AST activity in the birds that were 1-21 days of age.

Table 7- Plasma analyses of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and creatine kinase (CK) activity, and uric acid and creatinine content of broilers from the starter period

		ALT, U/L		AST, U/L		Uric acid mg/dL		Creatinine, mg/dL		CK, U/L	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	MD ¹	4.83 ^c	0.98	295.83	36.13	6.47	1.71	0.88 ^a	0.05	545.03	96.56
	MS	3.83 ^c	1.33	250.00	39.31	7.68	1.19	0.74 ^b	0.01	603.30	14.18
Stress	MD	24.67 ^a	6.02	292.50	50.88	1.73	0.61	0.67 ^b	0.11	323.80	113.54
	MS	9.83 ^b	2.23	274.67	38.18	2.68	1.18	0.70 ^b	0.05	337.30	121.43
Main effects											
Environment	Comfort	4.33	1.23	272.92	43.23	7.07 ^a	1.55	0.81	0.08	574.17 ^a	72.49
	Stress	17.25	8.87	283.58	43.89	2.21 ^b	1.03	0.68	0.08	330.55 ^b	112.30
Diet	MD	14.75	11.14	294.17	42.11	4.10 ^b	2.76	0.77	0.14	434.42	153.12
	MS	6.83	3.59	262.33	39.12	5.18 ^a	2.85	0.72	0.04	470.30	161.53
Probabilities											
Environment		<.0001		0.5363		<.0001		0.0002		<.0001	
Diet		<.0001		0.0751		0.0449		0.0667		0.3727	
Interaction		<.0001		0.4186		0.7950		0.0042		0.5758	

^{a, b, c} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05).

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

The effects of methionine supplementation and high temperature on the plasma analyses for the grower period are shown in Table 8.

The interaction between temperature and diet influenced the plasma ALT ($P < .0001$) activity.

The highest ALT activity was observed in the HS animals on the MD diet (10.00 U/L).

Both of the study variables influenced the AST and CK activity levels and the creatinine content. The HS animals had increased levels of AST activity and creatinine content and decreased levels of CK activity. Regarding the diet, the AST and creatinine values were higher and the CK activity level was lower in the animals on the MD diet than those on the MS diet.

We also observed an environmental effect on the uric acid content ($P < 0.0001$), with a lower value found in the HS animals than in those of the thermal comfort zone (4.27 vs. 2.16 mg/dL).

Table 8- Plasma analyses of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and creatine kinase (CK) activity, and uric acid and creatinine content of broilers from the grower period

		ALT, U/L		AST,U/L		Uric acid, mg/dL		Creatinine, mg/dL		CK, U/L	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	MD ¹	5.67 ^c	0.52	365.67	75.41	3.92	0.89	0.38	0.03	1538.95	99.38
	MS	6.50 ^b	1.22	271.83	45.81	4.63	0.08	0.32	0.03	1806.52	979.62
Stress	MD	10.00 ^a	0.01	409.83	34.01	2.05	1.02	0.42	0.01	534.28	115.17
	MS	5.00 ^c	0.01	345.83	69.94	2.27	0.60	0.38	0.03	1434.33	175.29
Main effects											
Environment	Comfort	6.08	0.10	318.75 ^b	77.07	4.27 ^a	0.71	0.35 ^b	0.04	1672.73 ^a	678.39
	Stress	7.50	2.61	377.83 ^a	62.18	2.16 ^b	0.81	0.40 ^a	0.03	984.31 ^b	490.85
Diet	MD	7.83	2.29	387.75 ^a	60.36	2.98	1.34	0.40 ^a	0.03	1036.62 ^b	534.60
	MS	5.75	1.14	308.83 ^b	68.34	3.45	1.30	0.35 ^b	0.04	1620.42 ^a	698.53
Probabilities											
Environment		<.0001		0.0231		<.0001		0.0002		0.0032	
Diet		<.0001		0.0037		0.1414		0.0002		0.0101	
Interaction		<.0001		0.5414		0.4218		0.3854		0.1395	

^{a, b, c} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05).

¹MD, methionine deficient; MS, recommended level of methionine supplementation.

Discussion

The high production rates observed in broiler chickens are the result of not only intense animal breeding and rigorously balanced nutrition but also the structural changes that have occurred in the chickens through the years. The environmental temperature is a factor that directly affects the rates of production, and therefore, temperature remains the subject of many studies (Mashaly *et al.* 2004; Song *et al.* 2014)

The elevated temperatures cause a state of thermal stress in the chickens, which negatively affects the feed intake with the consequent reductions in body weight and poor animal development (Smith 1993). Thus, as expected, in this study we observed that the birds subjected to HS (38°C for 24 hours) had lower feed intake and lower body weight gain. The lower feed intake was a response by the animal to alleviate the increase in body temperature that was observed in the birds that were exposed to HS because the processes of digestion, absorption and metabolism of nutrients generate high levels of metabolic heat (Ferket and Genart 2006). Additionally, studies have shown an effect of heat stress on the expression of ghrelin in the glandular stomach and intestines of broilers, which suggested that this gene might be involved in the reduced feed intake that was induced by thermal stress (Lei *et al.* 2013; Song *et al.* 2012).

The reduced weight gain observed in the HS-treated animals occurred not only because of lower feed intake but also because of complex metabolic mechanisms (Lara and Rostagno 2013). When the animals are in organic homeostasis, a balance occurs between the anabolism and the catabolism of proteins; however, in the situations in which the birds suffer some type of stress with consequent metabolic and physiological changes, the balance is disrupted, with many indications of a state of metabolic stress (Ognik and Sembratowicz 2012). The pituitary gland synthesizes and releases growth hormone (GH), which acts on the entire body to promote growth. The action of GH is primarily through the insulin-like growth factor I (IGF-I). The action of GH coupled with IGF-I was previously observed in birds in studies that concluded that high levels of IGF-I were associated with an increase in body growth (Conlon and Kita 2002). When the birds are stressed by heat, the IGF-I levels are reduced (Willemsen *et al.* 2011), leading to decreased rates of protein synthesis and increased rates of protein degradation, which provide another explanation for the reduced weight gain.

In addition to the ambient temperature, the diet also influences the expression of the genes related to growth (Katsumata *et al.* 2002; Stubbs *et al.* 2002). Methionine

supplementation is correlated with higher protein deposition because the supplementation stimulates a greater expression of the genes related to the synthesis of proteins but reduces the expression of the genes related to the degradation of proteins (Tesseraud *et al.* 2007). One of the markers of metabolic protein degradation is the concentration of plasma creatinine. The levels of creatinine are typically related to kidney function, but in some cases the highest blood concentrations of creatinine are explained by increased muscular activity and not strictly by a renal lesion (Fernandes and Larsson 2000). In our study, the highest concentration of plasma creatinine in the 21-d-old birds was observed in animals fed the MD diet. In this growth period, the animals require more proteins for muscle deposition because of the higher growth rates (Toledo *et al.* 2007), and the lack of methionine supplementation possibly increased the catabolism of proteins in the body (McCarthy and Esser 2010) to provide substrates for the endogenous synthesis of these proteins, thereby increasing the level of creatinine in blood plasma. The animals in the grower phase that were exposed to the HS had a higher concentration of plasma creatinine than that in the animals that remained in the thermal comfort zone.

In addition to the effects mentioned above, a lack of amino acids was also related to changes in the expression of the mTOR protein, with consequent effects on the actions of the lysosomes. The amino acid deficiency induced autophagy not only to not stimulate the action of mTOR but also because the deficiency was related to the formation of complexes that were essential for the formation of the autophagosome (Jewell and Guan 2013). Moreover, the amino acids that are generated during the lysosomal action inhibit autophagy specifically to inhibit the formation of the autophagosomes (Jewell *et al.* 2013; Jewell and Guan 2013).

Inside the lysosome, degradation occurs through the action of various lysosomal enzymes, including the cathepsins in various forms, among them cysteine protease L2 or cathepsin L2 (CTSL2). As reported in some studies, the lack of nutrients in the diet and stress are factors that activate this degradation pathway (He and Klionsky 2009; Lee *et al.* 2012). However, in our study, although lower weight gain and increased creatinine concentration were observed in the animals subjected to HS and fed the MD diet, we observed no significant effects on the gene expression of *CTSL2*, which suggested that the treatments that were evaluated might influence this variable through other metabolic pathways, such as the ubiquitin-proteasome route that is also related to protein degradation (Lecker *et al.* 2006).

Oxidative stress is one of the major types of damage caused by heat stress (Lin *et al.* 2006; Yang *et al.* 2010), and in cells, it is a condition that occurs when there is an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), which is associated with failures in the antioxidant defense mechanisms. Animals have several enzymatic antioxidant systems, which include the actions of the enzymes superoxide dismutase (SOD) (Halliwell and Cross 1994) and catalase (Mates *et al.* 1999; Georgieva *et al.* 2006), and the glutathione system (Mahmoud and Edens 2003). Superoxide dismutase is found in different forms at different locations, e.g., Mn-SOD is in the mitochondria, and CuZn-SOD is in the cytosol (Halliwell 1994). Together, these forms act to control the production of free radicals. SOD is essential for the elimination of the superoxide free radicals that are generated in the dismutation reaction. The hydrogen peroxide that is formed is eliminated by the reactions catalyzed by catalase or by the glutathione system (Fang *et al.* 2002). In our work on the evaluation of the expression of SOD, we confirmed that when the animal was exposed to stressful situations, which ROS production is increased (Mujahid *et al.* 2005; Azad *et al.* 2010) as the organism searched for ways to assist in the protection from the ROS with the increased expression of enzymes with antioxidant effects. Notably, we recognized that the expression of SOD was also high in the animals with methionine supplementation in the diet.

As important as the enzymatic antioxidant systems, some nutrients such as vitamins, minerals, and amino acids may also act as organic antioxidants. Among these, uric acid is a compound with important antioxidant activity against the deleterious effects of reactive oxygen species (Simoiy *et al.* 2002; Stinefelt *et al.* 2005). In our study, we observed that the birds exposed to HS had lower concentrations of uric acid than those in the birds in the thermal comfort zone, which suggested that the increased concentration of uric acid was used to eliminate the ROS.

Methionine is an essential amino acid that is involved in various functions, which include the participation in the synthesis of cysteine, S-adenosylmethionine (SAM), and glutathione (Wang *et al.* 1997; Németh *et al.* 2004; Swennen *et al.* 2011). In addition to these functions, this amino acid is also involved in the antioxidant defense of the body, based on studies that demonstrated the direct protective effect from oxidative stress (Moskovitz *et al.* 2001).

The direct effect of methionine is because of the ability to react with ROS (Levine *et al.* 2000) in a reaction in which the methionine is oxidized reversibly to form methionine sulfoxide, which thereby protects the cell from the damaging action of the free radicals.

The enzyme methionine sulfoxide reductase A (*MsrA*) then catalyzes the reduction reaction of methionine sulfoxide back to methionine (Weissbach *et al.* 2005). After the reduction, the methionine residues in proteins are available to again react with ROS. The reduction process of the methionine sulfoxide is dependent on the action of the enzyme thioredoxin (*TRx*). In this reaction, thioredoxin is oxidized and then is reduced through the reactions catalyzed by thioredoxin reductase (*TRxR1*) (Koháryová and Kollárová 2008). Therefore, from this complex and coordinated enzymatic cycle, the catalytic elimination of reactive oxygen and nitrogen species dependent on methionine residues occurs (reviewed by Luo and Levine 2009). Accordingly, in our work, we found that the highest expression levels of *TRxR1* and *MsrA* occurred in the HS animals on the MS diet; this result suggested that the animals subjected to high temperatures had a greater requirement for the action of antioxidants and that this requirement was met with the methionine supplementation.

Additionally, during the metabolism of methionine, it is converted into homocysteine, and through remethylation, homocysteine is converted back into methionine or it can be converted into cysteine by the trans-sulfuration route (Stipanuk 2004). Studies have shown that the path of remethylation assumed importance when the concentrations of the methionine or SAM were reduced. For the trans-sulfuration, when the body experienced some type of stress that required greater cysteine production, there was a consequent increase in glutathione production (Mosharov *et al.* 2000). In previous work, we found that the birds exposed to heat stress and fed diets supplemented with methionine had greater expression of cystathionine β -synthase (*CBS*), an enzyme involved in the production of cysteine via the trans-sulfuration pathway, which suggested a greater antioxidant capacity in the birds fed the supplemented diet than that in those on a diet without the methionine supplementation (Del Vesco *et al.* 2015). Confirming that result, in our work, we observed that the HS birds had lower concentrations of homocysteine than those in the birds in the thermal comfort zone, which indicated that in situations of stress, large amounts of homocysteine were used for the production of cysteine to ensure increased glutathione production.

Previous studies showed that the activity of some enzymes in the blood act as stress markers. For example, high blood activity of AST and ALT was found in animals that experienced some type of injury (Khan *et al.* 2002; Khan *et al.* 2013) and low CK activity was found in stressed animals (Melesse *et al.* 2011). As previously reported in other studies, in our study, we observed increased activity of AST and ALT in the

animals that experienced the heat stress. However, it is important to note the effect of the methionine supplementation; the animals subjected to stress that were fed the diet supplemented with methionine had levels of AST activity that were similar to those of the animals that remained in the thermal comfort zone (Table 8).

Additionally, as noted in the literature and in our study, the HS animals had lower levels of CK activity. For the methionine supplementation, the animals that were fed the MD diet had lower CK activity than the animals on the MS diet. This result was most likely caused by the protection that glutathione provided in favor of CK because according to Gunst *et al.* (1998) the reduction in the concentration of extracellular glutathione was one of the factors that was related to lower CK activity. As discussed throughout this work, we believe that this result was because of the higher antioxidant capacity guaranteed by the methionine supplementation than without, which we observed in the expression of the *MsrA* and the *TRxRI* enzymes and finally in the activity of the enzymes used as biological markers of stress.

Our results support the hypothesis that heat stress, which increases the body temperatures of broilers, results in poor performance because of the induction of oxidative stress; methionine supplementation attenuated these effects of the heat stress by increasing the antioxidant capacity and by acting in the metabolic pathways that promote the growth of the broilers.

References

- Aluwong T, Kawu M, Raji M, Dzenda T, Govwang F, Sinkalu V, Ayo J (2013) Effect of yeast probiotic on growth, antioxidant enzyme activities and malondialdehyde concentration of broiler chickens. *Antioxidants* **2**, 326-339.
- Azad MAK, Kikusato M, Sudo S, Amo T, Toyomizu M (2010) Time course of ROS production in skeletal muscle mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **157**, 266-271.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ Journal* **5**, 9-19.
- Conlon MA, Kita K (2002) Muscle protein synthesis rate is altered in response to a single injection of insulin-like growth factor-I in seven-day-old leghorn chicks. *Poultry Science* **81**, 1543-1547.

- Del Vesco AP, Gasparino E, Grieser DO, Zancanela V, Soares MAM, Oliveira Neto AR (2015) Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes of acute heat stress-exposed broilers. *British Journal of Nutrition* **113**, 549-559.
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-879.
- Ferket PR, Gernat AG (2006) Factors that affect feed intake of meat birds: a review. *International Journal of Poultry Science* **5**, 905-911.
- Fernandes WR, Larsson MHMA (2000) Alterações nas concentrações séricas de glicose, sódio, ureia e creatinina, em equinos submetidos a provas de enduro de 30 Km com velocidade controlada. *Ciência Rural* **30**, 393-398.
- Georgieva NV, Koinarski V, Gadjeva V (2006) Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *The Veterinary Journal* **172**, 488-492.
- Gunst JJ, Langlois MR, Delanghe JR, De Buyzere ML, Leroux-Roels GG (1998) Serum creatine kinase activity is not a reliable marker for muscle damage in conditions associated with low extracellular glutathione concentration. *Clinical Chemistry* **44**, 939-943.
- Halliwell B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives* **102**, 1-12.
- Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* **344**, 721-724.
- Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions Part 5* **35**, 1147-1150.
- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics* **43**, 67-93.
- Jewell JL, Guan KL (2013) Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends in Biochemical Sciences* **38**, 233-242.
- Jewell JL, Russell RC, Guan KL (2013) Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 133-139.
- Katsumata M, Kawakami S, Kaji Y, Takada R, Dauncey MJ (2002) Differential regulation of porcine hepatic IGF-I mRNA expression and plasma IGF-I concentration by a low lysine diet. *Journal of Nutrition* **132**, 688-692.

- Khan HA, Alhomida AS, Sobki SH, Habib SS, Aseri ZA, Khan AA, Moghairi AA (2013) Serum markers of tissue damage and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Biomedical Research* **24**, 15-20.
- Khan WA, Khan A, Anjum AD, Rehman ZU (2002) Effects of induced heat stress on some biochemical values in broiler chicks. *International Journal of Agriculture and Biology* **4**, 74-74.
- Koháryová M, Kollárová M (2008) Oxidative stress and thioredoxin system. *General Physiology and Biophysics* **27**, 71-84.
- Lara LJ, Rostagno MH (2013) Impact of heat stress on poultry production. *Animals* **3**, 356-369.
- Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE (2006) Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 1807-1819.
- Lee J, Giordano S, Zhang J (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal* **441**, 523-540.
- Lei L, Hepeng L, Xianlei L, Hongchao J, Hai L, Sheikhahmadi A, Yufeng W, Zhigang S (2013) Effects of acute heat stress on gene expression of brain-gut neuropeptides in broiler chickens. *Journal of Animal Science* **91**, 5194-5201.
- Levine RL, Laurent MBS, Berlett J, Stadtman ER (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 15036-15040.
- Levine RL, Moskowitz J, Stadtman ER (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **50**, 301-307.
- Lin H, Decuyore E, Buyse J (2006) Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **144**, 11-17.
- Luo S, Levine RL (2009) Methionine in proteins defends against oxidative stress. *Journal Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 464-472.
- Mahmoud KZ, Edens FW (2003) Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **136**, 921-934.

- Mashaly MM, Hendricks GL, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH (2004) Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science* **83**, 889-894.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Castro IN (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **32**, 595-603.
- McCarthy JJ, Esser JA (2010) Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **13**, 230-235.
- Melesse A, Maak S, Schmidt R, Lengerken GV (2011) Effect of long-term heat stress on key enzyme activities and T3 levels in commercial layer hens. *International Journal of Livestock Production* **2**, 107-116.
- Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* **39**, 13005-13011.
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12920-12925.
- Mujahid A, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M (2006) Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poultry Science* **85**, 1259-1265.
- Mujahid A, Yoshiki Y, Akiba Y, Toyomizu M (2005) Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science* **84**, 307-314.
- Németh K, Mézes M, Gaál T, Bartos A, Balogh K, Husvéth F (2004) Effect of supplementation with methionine and different fat sources on the glutathione redox system of growing chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* **52**, 69-378.
- Ognick K, Sembratowicz I (2012) Stress as a factor modifying the metabolism in poultry. A review. In 'Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin'. pp.34-43. (University of Life Sciences in Lublin: Akademicka).
- Oliveira RFM, Donzele JL, Abreu MLT., Ferreira RA, Vaz RGMV, Cella PS (2006). Effects of temperature and relative humidity on performance and yield of noble cuts of broilers from 1 to 49 days old. *Brazilian Journal of Animal Science* **35**, 797-803.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* **24**, 981-990.

- Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT (2011). 'Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements'.(Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brazil).
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82**, 291-295.
- Simoyi M, Van Dyke FK, Klandorf H (2002) Manipulation of plasma uric acid in broiler chicks and its effect on leukocyte oxidative activity. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **282**, R791-R796.
- Smith MO (1993) Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. *Poultry Science* **72**, 1146-1150.
- Song J, Xiao K, Ke YL, Jiao LF, Hu CH, Diao QY, Shi B, Zou XT (2014) Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science* **93**, 581-588.
- Song Z, Liu L, Sheikahmadi A, Jiao H, Lin H (2012) Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2012/484869.
- Stinefelt B, Leonard SS, Blemings KP, Shi X, Klandorf H (2005) Free radicals scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid. *Annals of Clinical & Laboratory Science* **35**, 37-45.
- Stipanuk MH (2004) Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition* **24**, 539-77.
- Stubbs AK, Wheelhouse NM, Lomax MA, Hazlerigg DG (2002) Nutrient-hormone interaction in ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-1 gene expression. *Journal of Endocrinology* **174**, 335-341.
- Swennen Q, Geraert AP, Mercier Y, Everaert N, Stinckens A, Willemsen H, Li Y, Decuypere E, Buyse J (2011) Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. *British Journal of Nutrition* **106**, 1845-1854.
- Tesseraud S, Coustard-Métayer S, Boussaid S, Crochet S, Audouin E, Derouet M, Seiliez I (2007) Insulin and amino acid availability regulate atrogen-1 in avian QT6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**, 181-186.
- Toledo AL, Takeara P, Bittencourt LC, Kobashigawa E, Albuquerque R, Neto MAT (2007) Níveis dietéticos de lisina digestível para frangos de corte machos no

- período de 1 á 11 dias de idade: desempenho e composição corporal. *Brazilian Journal of Animal Science* **36**, 1090-1096.
- Wang ST, Chen HW, Sheen LY, Lii CK (1997) Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione S-transferase isozymes in rat hepatocytes. *Journal of Nutrition* **127**, 2135-2141.
- Weissbach H, Resnicka L, Broth N (2005) Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta* **1703**, 203-212.
- Willemsen H, Swennen Q, Everaert N, Geraert PA, Mercier Y, Stinckens A, Decuypere E, Buyse J (2011) Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasm hormone levels, and the redox status of broiler chickens expose to high temperatures. *Poultry Science* **90**, 2311-2320.
- Yang L, Tan GY, Fu QF, Feng JH, Zhang MH (2010) Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comparative Biochemistry Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology* **151**, 204-208.

CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados de forma conjunta nos permitem concluir que o consumo de ração é função de diversos fatores ainda desconhecidos, e que alguns genes hipotalâmicos podem estar envolvidos nas diferenças observadas no consumo voluntário de ração entre animais de diferentes sexos e expostos a diferentes condições ambientais. No que se refere ao metabolismo lipídico, concluimos que alguns dos mecanismos que diferenciam machos de fêmeas, e aves de 21 das aves de 42 dias, podem estar relacionados com a maior expressão de genes relacionados à síntese de lipídeos. Além disso, as aves com maior necessidade energética devido à maior taxa metabólica podem lançar mão de rotas relacionadas à maior oxidação lipídica através da maior expressão dos genes *LKB1*, *AMPK α -1*, e *APOA-1*. Em adição, a análise dos nossos resultados nos permite concluir que a suplementação de metionina pode atenuar os efeitos do estresse por calor, por otimizar a capacidade antioxidante orgânica, através do estímulo de maior expressão de genes relacionados à atividade antioxidante, e por atuar em vias metabólicas que promovem o crescimento dos frangos.