

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO PROTEÔMICO DO TECIDO HEPÁTICO E MUSCULAR DE FRANGOS
DE CORTE SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ

ANDREY SÁVIO DE ALMEIDA ASSUNÇÃO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção
do título de Doutor em Zootecnia

BOTUCATU - SP
Agosto – 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO PROTEÔMICO DO TECIDO HEPÁTICO E MUSCULAR DE FRANGOS
DE CORTE SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ

ANDREY SÁVIO DE ALMEIDA ASSUNÇÃO
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção
do título de Doutor em Zootecnia

BOTUCATU - SP
Agosto – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Assunção, Andrey Sávio de Almeida.

Estudo proteômico do tecido hepático e muscular de frangos de corte suplementados com óleo da semente de maracujá / Andrey Sávio de Almeida Assunção. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 50403001

1. Frango de corte - Efeito do stress. 2. Estresse oxidativo. 3. Proteínas de choque térmico. 4. Sementes oleaginosas. 5. Maracujá. 6. Transtornos de estresse por calor.

Palavras-chave: 2D-PAGE; Estresse cíclico por calor; Estresse oxidativo; Gel free; Proteínas de choque térmico.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Andrey Sávio de Almeida Assunção, filho de Silnea Gonçalina de Almeida Assunção e Manoel Santana Araújo de Assunção, nasceu em 28 de novembro de 1992 na cidade de Várzea Grande - MT. Em fevereiro de 2012 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Cuiabá e graduou-se em setembro de 2016. Durante a graduação foi bolsista do programa de bolsas de extensão (2014) e bolsista de iniciação tecnológica – PIBITI (2015). Em março de 2017 iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados, sendo bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), concluindo o curso em fevereiro de 2019. Em março do mesmo ano iniciou o curso de Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “*Júlio de Mesquita Filho*” – Câmpus de Botucatu, onde foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq). Em junho de 2021, ingressou na empresa BRF como Técnico de Produção II, atuando na Granja de Avós de Frango, unidade de Brotas/SP.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Silnéia Gonçalina de Almeida, que sempre esteve ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória, me incentivando, servindo de exemplo, se dedicando, esforçando e cuidando de mim, do meu sobrinho e das minhas irmãs.

Meu eterno agradecimento, carinho e amor. Te amo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha companheira, amiga e eterna namorada, Renata Aparecida Martins. Por acreditar no meu potencial, me incentivar, me guiar e ajudar em todos os momentos, pelo exemplo de mulher que és, pelo amor, atenção, carinho e por todos os momentos alegres que passamos juntos. Amo você!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, especialmente a FMVZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia), pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Deixo um agradecimento especial ao meu orientador, prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela orientação, atenção, amizade, oportunidades, ensinamentos e por sempre contribuir para o meu crescimento profissional.

Ao prof. Dr. José Roberto Sartori pela orientação, oportunidades, confiança, atenção, pelos diálogos, ensinamentos e conhecimentos adquiridos.

Ao Pós-doutorando José Cavalcante Souza Vieira pela ajuda no decorrer das análises, colaboração, pelos momentos divertidos, histórias engraçadas e amizade ao longo deste curso.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia (FMVZ) que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste curso.

À minha mãe, pelo amor, carinho, cuidados, força, dedicação e ajuda em todos os momentos. Tudo que sou é graças à senhora. Meu eterno carinho, amor e agradecimento. Te amo!

À minha companheira, amiga e eterna namorada, Renata Aparecida Martins. Pelo amor, atenção, carinho e companheirismo em todos os momentos difíceis e alegres que passamos juntos. Amo você!

Às minhas irmãs, Andressa e Andrielly, da nossa união de sempre principalmente nos momentos difíceis, das brincadeiras e recordações alegres. Amo vocês!

Ao meu amigo e padraсто Simão, exemplo de pessoa. Sempre disposto a ajudar. Obrigado pelo carinho, momentos divertidos e por cuidar das meninas “superpoderosas” (Andressa, Andrielly e Silnéia).

Aos sobrinhos João Pedro (meu eterno “João bolão”) e Erik Martins, pelos momentos divertidos. Espero que este trabalho seja um exemplo de motivação para que no futuro sejam grandes profissionais. Amo vocês!

Sou grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida, especialmente, a minha vó (Juraci Curado) e madrinha Pedrosa, pela confiança e

demonstração de fé inabalável, as minhas tias Sebastiana, Benedita e Marinei, aos tios Manoel, Jacó, Nei e Pedro (*in memoriam*), primos e primas pela presença constante.

Aos integrantes do Laboratório de Bioanalítica e Metaloproteômica (LBM): José Cavalcante Souza Vieira, Grasieli de Oliveira, Renata Aparecida Martins, Leone Rocha, Wellington Luiz de Paula Araújo, Otávio Augusto de Freitas Apostólico e Maria Gabriela de Albuquerque Santiago, pelos momentos divertidos, aprendizagem constantes e ajuda durante a realização dos experimentos.

Aos integrantes do Laboratório de Nutrição de Aves - LabAves, Cássio Yutto Oura, Jéssica Moraes Cruvinel, Julianna dos Santos Batistioli, Érica Santos Mello, Fernanda Kaiser de Lima, Priscila Michelin Groff-Urayama e Tatiane Souza dos Santos, pelas reuniões de estudo, dedicação e ajuda durante a realização dos experimentos.

À Granja Avós Califórnia (BRF S.A.), pela oportunidade de experiência profissional durante a realização do doutorado, por todo conhecimento adquirido, pelos desafios propostos a cada dia, especialmente ao Marcelo Antônio, Valdinei Zandonay, Julianna Batistioli, Adriana Camargo, Dirceu Romualdo, Edir Andrade, Jurandir Paixão, Claudio Roberto, Luis Henrique e Natasha Risatto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos vocês, muito obrigado!

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.”

Stephen Hawking

RESUMO GERAL

Entre as alternativas estudadas para substituir o uso de antibióticos na avicultura industrial, destacam-se os produtos compostos por óleos essenciais e/ou extratos vegetais, denominados de aditivos fitogênicos. Esses produtos possuem potencial pois são naturais e livre de resíduos em comparação aos antibióticos. Dentre os aditivos naturais com potencial de serem utilizados na prática industrial, encontra-se o óleo da semente de maracujá (OSM). No entanto, não há relatos na literatura científica sobre a utilização de abordagens proteômicas para elucidar o efeito do OSM sobre o proteoma hepático e muscular de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. A proteômica permite avaliar as mudanças na expressão de proteínas de tecidos e fluídos, auxiliando dessa forma, na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na saúde, bem-estar, estresse e estados patológicos dos animais. Neste sentido, a tese foi dividida em dois capítulos principais correspondendo aos artigos científicos. **Artigo 1** - O objetivo com o presente estudo foi investigar o efeito da suplementação do OSM sobre o perfil diferencial de proteínas expressas no tecido hepático de frangos de corte submetidos ao estresse cíclico por calor. Para isso, 225 pintainhos machos de 1 dia de idade foram alojados em gaiolas dispostas em câmara climática onde foram mantidos sob estresse cíclico por calor durante oito horas por dia. Foram formuladas cinco dietas experimentais a base de milho e farelo de soja, sendo uma dieta controle (sem adição de OSM) e quatro dietas nas quais foi realizada a inclusão de diferentes níveis de OSM (0,30; 0,50; 0,70 e 0,90%). Aos 36 dias de idade, nove aves de cada tratamento foram abatidas para coleta das amostras de fígado. A partir de *pools* das amostras de fígado, foi realizado o fracionamento do proteoma hepático por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e caracterização das proteínas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). A suplementação de 0,90% de OSM aumentou a expressão de sete proteínas de choque térmico, enquanto foi observado menor expressão de seis proteínas antioxidantes. Proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e de carboidratos também apresentaram alterações na expressão. Estes resultados sugerem que a suplementação de OSM influencia a ativação de mecanismos de reparação dos danos provocados pela exposição cíclica ao calor por meio do aumento da expressão das chaperonas moleculares no tecido hepático. **Artigo 2** - O objetivo com este estudo foi caracterizar as proteínas diferencialmente expressas no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com OSM em condições de estresse cíclico por calor. Para isso, 90

pintainhos machos de um dia de idade foram alojados em gaiolas dispostas em câmara climática onde foram mantidos sob estresse cíclico por calor durante oito horas por dia. As aves foram distribuídas em dois grupos experimentais, sendo um grupo suplementado com 0,90% de OSM e um grupo controle (CON) sem a suplementação de OSM. Aos 36 dias de idade, 18 aves foram abatidas para coleta das amostras de músculo. A partir de *pools* das amostras de filé de peito de cada grupo, foi realizado a clivagem proteolítica dos extratos proteicos e posteriormente a análise dos peptídeos por *LC-MS/MS*. A suplementação de 0,90% de OSM revelou a modulação de 57 proteínas no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. Dentre elas, quatro proteínas foram reguladas positivamente e 46 proteínas foram reguladas negativamente. Além disso, sete proteínas foram expressas unicamente no grupo CON. Estes resultados sugerem que a suplementação de OSM demonstrou mecanismo adaptativo para aumentar a tolerância ao calor, reduzindo o estresse oxidativo. Além disso, promoveu ativação de mecanismos de neuroproteção, proteção celular contra ocorrência de apoptose celular, diminuição das respostas inflamatórias e regulação do metabolismo energético.

Palavras-chave: *2D-PAGE*, *Gel free*, estresse cíclico por calor, estresse oxidativo, proteínas de choque térmico

ABSTRACT

Among the alternatives studied to replace the use of antibiotics in industrial poultry, products composed of essential oils and/or plant extracts, called phytogetic additives, stand out. These products have potential because they are natural and residue-free compared to antibiotics. Among the natural additives with the potential to be used in industrial practice, there is passion fruit seed oil (OSM). However, there are no reports in the scientific literature on the use of proteomic approaches to elucidate the effect of OSM on the liver and muscle proteome of broilers exposed to cyclic heat stress. Proteomics allows the evaluation of changes in the expression of proteins in tissues and fluids, thus helping to understand the molecular mechanisms involved in the health, welfare, stress, and pathological states of animals. Thus, the thesis was divided into two main chapters corresponding to the papers. **Paper 1** - The aim of the present study was to investigate the effect of OSM supplementation on the differential profile of proteins expressed in the liver tissue of broilers subjected to cyclic heat stress. For this, 225 1-day-old male chicks were housed in cages in a climatic chamber where they were kept under cyclic heat stress for eight hours a day. Five experimental diets based on corn and soybean meal were formulated, being a control diet (without addition of OSM) and 4 diets in which different levels of OSM were included (0.30; 0.50; 0.70 and 0.90%). At 36 days of age, nine birds from each treatment were slaughtered to collect liver samples. From pools of liver samples from each treatment, fractionation of the liver proteome was performed by two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and characterization of proteins by sequence mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS). Supplementation of 0.90% OSM increased the expression of seven heat shock proteins, while lower expression of six antioxidant proteins was observed. Proteins involved in lipid and carbohydrate metabolism also showed changes in expression. These results suggest that OSM supplementation influences the activation of damage repair mechanisms caused by cyclic exposure to heat by increasing the expression of molecular chaperones in liver tissue. **Paper 2** - The aim of this study is to characterize the proteins differentially expressed in the Pectoralis major muscle of broilers, supplemented with OSM under cyclic heat stress conditions. For this, 90 one-day-old male chicks were housed in cages in a climatic chamber, where they were kept under cyclic heat stress for eight hours a day. The birds were divided into two experimental groups, one group supplemented with 0.90% OSM and a control group (CON) without OSM supplementation. At 36 days of

age, 18 birds were slaughtered to collect muscle samples. From pools of breast fillet samples (*Pectoralis major* muscle) of each group, the proteolytic cleavage of the protein extracts was performed and later the analysis of the peptides by LC-MS/MS. Supplementation of 0.90% OSM revealed the modulation of 57 proteins in the *Pectoralis major* muscle of broilers exposed to cyclic heat stress. Among them, four proteins were upregulated and 46 proteins were down-regulated. In addition, seven proteins were expressed only in the CON group. These results suggest that OSM supplementation demonstrated an adaptive mechanism to increase heat tolerance, reducing oxidative stress. In addition, it promoted activation neuroprotection mechanisms, cellular protection against the occurrence of cellular apoptosis decreased inflammatory responses and regulation of energy metabolism.

Keywords: 2D-PAGE, Gel free, cyclic heat stress, oxidative stress, heat shock proteins

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

BSA – Albumina de soro bovino

Ca – Cálcio

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CON – Controle

CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

Da - Dalton

DOWN - *Downregulated*

DTT – Ditioneitol

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FDR – Taxa de descoberta falsa (*False discovery rate*)

GO – *Gene Ontology*

HSP – Proteínas de choque térmico (*Heat shock protein*)

IEF – Focalização isoelétrica (*Isoelectric focusing*)

KDa - Quilodalton

KEGG - Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*)

LC-MS/MS - Espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (*Liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

MW - *Molecular weight*

OSM – Óleo da semente de maracujá

pH - Potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

PLGS - *Protein Lynx Global Server*

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

UP – *Upregulated*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Principais tipos de maracujá: (A) *Passiflora edulis sims* e (B) *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Fonte: Khuwijitjaru e Klinchongkon (2020)..... 20
- Figura 2.** Principais abordagens proteômicas: baseado em gel e sem gel. Adaptado de Almeida et al. (2015)..... 24
- Figura 3.** Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) do músculo *Pectoralis major* de frango. Fonte: Cai et al. (2018)..... 25
- Figura 4.** Fluxograma representando abordagem proteômica na investigação de biomarcadores de proteínas de estresse. Adaptado de Mouzo et al. (2020)..... 27

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) do tecido hepático de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor. C: controle, OSM: óleo da semente de maracujá 54
- Figura 2.** Classificação das proteínas caracterizadas no proteoma hepático de frangos de corte utilizando o *software* Blast2GO 61
- Figura 3.** Rede de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas do fígado de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor 62

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Classificação das proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular de frangos de corte suplementados com OSM submetidos ao estresse cíclico por calor.... 89
- Figura 2.** Rede de interação proteína-proteína das proteínas *upregulated* e *downregulated* no tecido muscular de frangos de corte suplementados com OSM.... 90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeitos do estresse térmico por calor no proteoma de aves utilizando diferentes métodos proteômicos.....	32
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Temperaturas médias registradas na câmara climática sob estresse cíclico por calor durante o período experimental	47
Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 33 dias de idade) e final (34 a 42 dias de idade).....	49
Tabela 3. Proteínas identificadas no fígado de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS).....	55
Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas (teste t, $P < 0,05$) no fígado de frangos de corte suplementados com OSM (0,3; 0,5; 0,7 e 0,9%) sob estresse cíclico por calor em relação ao controle.....	60
Tabela 5. Vias metabólicas significativamente enriquecidas utilizando <i>Reactome</i>	62

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Temperaturas médias registradas na câmara climática sob estresse cíclico por calor durante o período experimental	80
Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 33 dias de idade) e final (34 a 42 dias de idade).....	81
Tabela 3. Proteínas <i>upregulated</i> (Up) ou <i>downregulated</i> (Down) no grupo suplementado com 0,9% de OSM em comparação com o grupo controle sem suplementação de OSM em condições de estresse cíclico por calor	85
Tabela 4. Proteínas expressas unicamente no grupo controle (CON)	86
Tabela 5. Vias <i>KEGG</i> significativamente enriquecidas ($FDR < 0,05$) utilizando o <i>software Cytoscape</i> com o plugin <i>String</i>	87

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.1. Atividades biológicas e composição do maracujá amarelo	19
1.2. Uso de subprodutos do maracujá na alimentação de frangos de corte	20
1.3. Óleo da semente de maracujá – OSM.....	21
1.4. Proteômica	22
1.5. Diferentes abordagens proteômicas: <i>2D-PAGE</i> e <i>Shotgun</i>	24
1.6. Proteômica na produção animal.....	26
1.7. Abordagem proteômica do estresse térmico em frangos de corte	27
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVO	33
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2	43
<i>Óleo da semente de maracujá na dieta de frangos de corte altera o proteoma hepático em condições de estresse cíclico por calor</i>	44
RESUMO.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e Métodos.....	46
2.1. Animais, tratamentos, delineamento experimental e coleta das amostras	46
2.2. Preparação da amostra: extração, precipitação e quantificação das proteínas	47
2.3. Eletroforese em gel bidimensional (<i>2D-PAGE</i>)	48
2.4. Análise de imagem.....	51
2.5. Caracterização das proteínas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (<i>LC-MS/MS</i>)	51
2.6. Análise estatística.....	51
2.7. Vias metabólicas e interação proteína-proteína	52
3. Resultados	52
4. Discussão	63
4.1. Chaperonas moleculares	63
4.2. Proteínas antioxidantes	64
4.3. Metabolismo de lipídeos	65

4.4. Metabolismo de carboidratos	66
5. Conclusão	67
6. Referências.....	68
CAPÍTULO 3	76
<i>Proteômica shotgun revela alterações no músculo Pectoralis major de frangos de corte suplementados com óleo da semente de maracujá sob condições de estresse cíclico por calor.....</i>	<i>77</i>
RESUMO	77
1. Introdução.....	78
2. Material e métodos.....	79
2.1. Animais e grupos experimentais	79
2.2. Coleta das amostras.....	80
2.3. Extração e quantificação das proteínas	80
2.4. Digestão das proteínas em solução	83
2.5. Identificação e análise de expressão das proteínas	83
2.6. Análise de bioinformática	84
3. Resultados	84
4. Discussão	90
4.1. Resposta ao estresse oxidativo.....	90
4.2. Neurofilamento	91
4.3. Apoptose	91
4.4. Via de ativação do fator de transcrição <i>NF-κB</i>	93
4.5. Metabolismo energético.....	93
5. Conclusão	94
6. Referências.....	94
CAPÍTULO 4	102
IMPLICAÇÕES.....	103

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O uso de antibióticos como melhoradores de desempenho à base de agentes antimicrobianos na alimentação animal é prática frequente, uma vez que proporciona aumento da eficiência de utilização dos alimentos e melhora os índices produtivos (TRAESSEL et al., 2011). Entretanto, tal prática vem sofrendo restrições devido a seleção de microrganismos patogênicos resistentes, e possível desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada em humanos, além da preocupação do mercado consumidor em relação aos produtos livres de resíduos de antibióticos e seu impacto na saúde humana (MENTEN et al., 2014).

A retirada desses antibióticos nas dietas dos animais de produção é uma tendência global que está sendo adotada nos últimos anos (ZHANG et al., 2014). Desta forma, a demanda por ingredientes alternativos que possam substituí-los e que sejam econômicos, sustentáveis e biologicamente funcionais tornam-se interessantes. Dentre as alternativas investigadas na atualidade para substituir o uso de antibióticos na alimentação de animais não ruminantes, destacam-se os produtos compostos por óleos essenciais e/ou extratos vegetais, denominados de aditivos fitogênicos. Esses produtos possuem potencial pois são naturais e livre de resíduos em comparação aos antibióticos (GONG et al., 2014).

Os subprodutos agroindustriais resultantes do processamento de frutas tropicais, como maracujá, abacaxi, manga, mamão, goiaba, banana, uva, morango e cítricos (JANZANTTI; MONTEIRO, 2014) representam uma fonte potencial de ingredientes alimentares naturais, uma vez que são ricos em compostos bioativos, como constituintes fenólicos, carotenóides, vitaminas e fibras alimentares (AYALA-ZAVALA et al., 2011; DEMBITSKY et al., 2011), que podem ser adicionados nas dietas de aves em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho. Além disso, torna-se uma solução ambiental para a indústria de processamento de frutas para destinar grande porcentagem de subprodutos, como cascas, sementes e púlpas desperdiçadas, gerados nas diferentes etapas das cadeias de processamento (AYALA-ZAVALA et al., 2011).

Com o propósito de compreender os mecanismos moleculares que a suplementação do óleo da semente de maracujá pode exercer sobre o metabolismo dos frangos de corte, abordagens proteômicas podem ser usadas para esclarecerem mudanças na expressão de proteínas em tecidos e fluídos biológicos desses animais (WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Para este propósito, a eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE), proteômica *shotgun* e a espectrometria de massas em sequência acoplada com

cromatografia líquida (LC-MS/MS) podem ser utilizadas (BALDASSINI et al., 2018; KUNIYOSHI et al., 2019; BOUDON et al., 2020). Outra possibilidade é a utilização dos métodos proteômicos para fornecerem informações a respeito da qualidade da carne, principalmente como ferramenta na exploração de potenciais biomarcadores que podem estar associados a qualidade de carne em frangos de corte (SCHILLING et al., 2017; HUANG et al., 2020).

O fígado, um dos tecidos biológicos mais vitais do corpo, exerce função essencial nas aves domésticas porque desempenha papel central no metabolismo energético, sendo importante na manutenção da homeostase geral do organismo, uma vez que o perfil de proteínas expressas por ele pode auxiliar na compreensão das variações no metabolismo das aves (ZENG et al., 2013; ZHENG et al., 2016; JASTREBSKI; LAMONT; SCHMIDT, 2017). Pelo exposto, o estudo do óleo da semente de maracujá em frangos de cortes pode fornecer *insights* sobre a expressão diferencial de proteínas, bem como levar a elucidação de possíveis mecanismos de respostas frente a vários desafios em aves, seja ambiental, sanitário ou nutricional.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Atividades biológicas e composição do maracujá amarelo

Nativo da América do Sul, o maracujá é uma fruta tropical que pertence à família *Passifloraceae* e que pode ser consumida *in natura* e transformadas em diversos produtos (KHUWIJITJARU; KLINCHONGKON, 2020). A família *Passifloraceae* é composta por mais de 600 espécies distribuídas em 18 gêneros; entretanto, o gênero *Passiflora* se destaca pelo número de espécies e pelo valor econômico (PEREIRA; CORRÊA; OLIVEIRA, 2015). As espécies de maracujá que apresentam importância econômica e são cultivadas em várias partes do mundo para finalidades comerciais são as espécies roxa (*Passiflora edulis sims*) e amarela (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) (Figura 1). No Brasil, o maracujá amarelo é a espécie mais cultivada e ocupa uma área plantada de cerca de 61.600 hectares, sendo utilizado particularmente para preparação de sucos (OLIVEIRA; FRIZZAS, 2014). De acordo com o relatório publicado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a produção global de maracujá atingiu aproximadamente 1.468,8 milhão de toneladas por ano entre 2015 e 2017. Este relatório indica o Brasil como principal produtor mundial, representando 64,55% da produção com 948.100 mil toneladas produzidas ao ano (ALTENDORF, 2018).

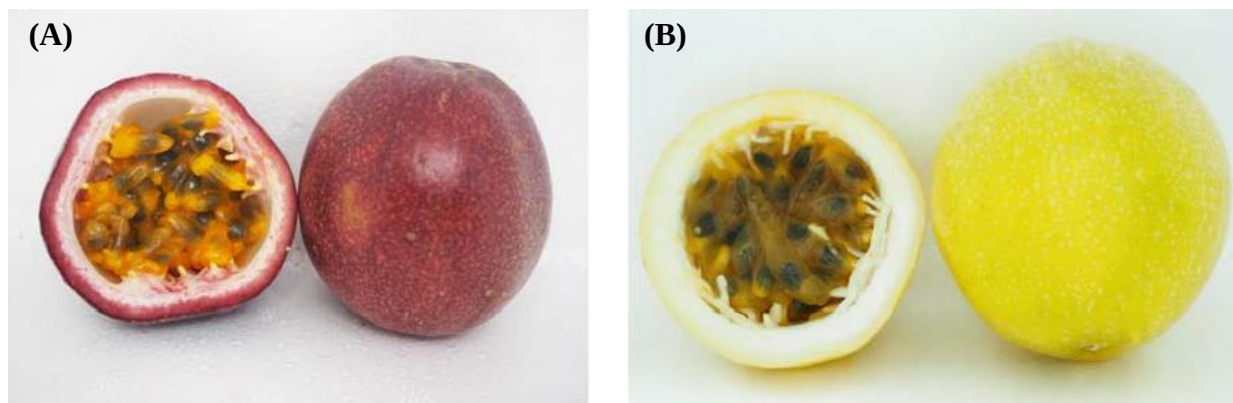


Figura 1. Principais tipos de maracujá: (A) *Passiflora edulis* Sims e (B) *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Fonte: Khuwijitjaru e Klinchongkon (2020).

A principal atividade envolvendo o maracujá (*Passiflora* spp.) é a produção de suco, embora o gênero *Passiflora* seja amplamente utilizado na medicina tradicional como sedativo e ansiolítico, e explorado pela indústria alimentícia, farmacológica e cosmética (CORRÊA et al., 2016). A fruta possui alto teor de fibras e minerais e é considerada uma fonte útil de pró-vitamina A, ácido ascórbico, riboflavina e niacina. As sementes são ricas em compostos polifenólicos (piceatanol e scirpusina B) e fornecem alto teor de fibra dietética insolúvel e magnésio (WIJERATNAM, 2016).

O maracujá possui muitos compostos importantes que promovem a saúde e que podem ser considerados constituintes atrativos para a produção de alimentos funcionais (QIU et al., 2020). A utilização do consumo do maracujá na alimentação humana oferece diversos aspectos positivos, incluindo aumento da função imunológica, melhora da visão, aumento da saúde da pele, regulação do equilíbrio de fluidos do corpo, diminuição da pressão arterial, estimulação da circulação sanguínea, melhora da densidade mineral óssea, redução dos sinais de envelhecimento prematuro, melhora dos hábitos de sono e eliminação da asma (WIJERATNAM, 2016).

1.2. Uso de subprodutos do maracujá na alimentação de frangos de corte

O processamento de frutas tropicais, como o maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) para produção de suco, gera grandes quantidades de subprodutos, principalmente cascas e sementes, representando cerca de 65 a 70% do peso do fruto, que em grande parte são descartadas (OLIVEIRA et al., 2002; FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004), gerando um volume significativo de resíduos. Tanto a polpa quanto a casca do maracujá representam boa fonte de fibra solúvel e insolúvel que podem auxiliar na melhoria da saúde intestinal, como por exemplo na modulação da microbiota e produção de ácidos graxos de cadeia curta, como o acético, propiônico e butírico (SILVA et al., 2014; WIJERATNAM, 2016).

Além disso, os compostos bioativos (flavonóides e carotenóides) presentes na casca podem minimizar os efeitos do estresse oxidativo, melhorando o sistema antioxidante e reduzindo a peroxidação lipídica no fígado (VUOLO et al., 2020).

Outro subproduto oriundo da extração do suco de maracujá é a semente que embora seja comestível, após processamento é tratada como resíduo. A semente é constituída como uma fonte rica em fenólicos antioxidantes, principalmente ácido rosmarínico, além de ser rica em ácido linoléico (65%) (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2020).

O uso de subprodutos de maracujá na alimentação animal, principalmente cascas e sementes, pode ser aplicado como alternativa viável em áreas próximas à fábrica de processamento de suco, devido a facilidade da obtenção dos resíduos e menor custo com transporte. Estudos utilizando subprodutos de maracujá demonstraram que estes podem ser utilizados na alimentação de aves como um potente alimento alternativo, pois não afetam o desempenho produtivo dos animais (TOGASHI et al., 2007, 2008; FACHINELLO et al., 2016; TORRES et al., 2019).

Zanetti et al. (2016, 2017) estudando níveis (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5%) de inclusão de farelo da semente de maracujá (*Passiflora edulis*) na alimentação de frangos de corte e poedeiras comerciais, verificaram efeito positivos no desempenho produtivo e na diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol sanguíneos; além disso comportando-se como antioxidante natural pelo aumento do tempo de vida útil da carne e ovos. No entanto, os autores observaram diminuição da altura das vilosidades do jejuno em virtude do alto teor de fibra bruta encontrado no subproduto, afetando a saúde intestinal dos animais.

1.3. Óleo da semente de maracujá – OSM

As sementes oriundas do processamento de maracujá possuem elevado teor de óleo em sua composição. O óleo de maracujá extraído por meio de prensagem a frio consegue passar para o óleo todos os ácidos graxos e as propriedades medicinais contidas nas sementes. Além disso, possui textura leve, alto teor de ácidos graxos insaturados (ácido linoleico e oleico), vitamina C e A e algumas do complexo B, bem como sais minerais, como fósforo, zinco e ferro (EMBRAPA, 2013; WILHELM et al., 2014), e ainda pode ser utilizados para fabricação de sabonetes, xampus, cosméticos, produtos de limpeza e óleos essenciais (LEÃO et al., 2014).

A composição de ácidos graxos do óleo de semente de maracujá (OSM) é semelhante ao do óleo da semente de uva ou de cártamo (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2019). No OSM, os ácidos graxos insaturados representam de 84 a 89%, incluindo ácido linoleico (70%), ácido oleico (15%) e pequena quantidade de linolênico, enquanto o ácido palmítico (10%) e ácido esteárico (2%) são os principais ácidos graxos saturados (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; KHUWIJITJARU; KLINCHONGKON, 2020).

Embora o modo de ação do OSM no metabolismo de frangos de corte não foi elucidado, a suplementação dietética deste aditivo fitogênico pode favorecer o metabolismo lipídico, a capacidade de estimular a digestão, o potencial antiinflamatório, aspectos sensoriais da carne e as propriedades antimicrobianas e antioxidantes (ACAMOVIC; BROOKER, 2005; BRENES; ROURA, 2010).

De forma a eliminar o efeito prejudicial que o subproduto da semente de maracujá pode originar, como na pesquisa citada anteriormente de Zanetti et al. (2016, 2017), a suplementação do óleo extraído da semente de maracujá em dietas avícolas, sem a porção fibrosa, torna-se vantajosa do ponto de vista nutricional. Além disso, em virtude do alto teor de polifenóis, vitaminas e das excelentes características físico-químicas podem indicar o potencial do óleo de maracujá como alimento funcional (KOBORI; JORGE, 2005; ZERAIK et al., 2010; SILVA; JORGE, 2016).

Ao investigarem os óleos extraídos das sementes de várias frutas oriundas de subprodutos agroindustriais, Silva e Jorge (2016) identificaram para o óleo da semente de maracujá a maior presença do isômero δ -tocoferol, representando 52,2% do total de tocoferóis, além de compostos bioativos como carotenóides, fenólicos (Ácidos cafeico, salicílico e p-cumárico) e fitoesteróis (Campesterol, Estigmasterol, β -Sitosterol e Estigmastanol). De acordo com estes autores, os compostos bioativos presentes no OSM demonstram alta capacidade para atuarem como antioxidante natural e auxiliarem na prevenção de danos causados pela oxidação lipídica.

1.4. Proteômica

A proteômica permite o estudo em alta escala de todas as proteínas presentes em uma determinada célula, tecido ou fluído, o proteoma. É de importância significativa para inúmeras áreas científicas, incluindo as ciências animais e veterinárias (ALMEIDA et al., 2015). Além disso, o proteoma representa o perfil proteico completo da amostra de interesse biológico e é o resultado de uma síntese baseada em dados genômicos e

transcriptômicos (ZAPALSKA-SOZONIUK et al., 2019). Sua área engloba a identificação e quantificação de proteínas em sistemas biológicos, análise de mudanças na expressão das proteínas, caracterização de modificações pós-traducionais e estudos de interações proteína-proteína, em um determinado momento perante um conjunto específico de condições (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003). Essas características associadas ao caráter dinâmico e das alterações em virtude de resposta a fatores celulares ou ambientais demonstram a complexidade do proteoma quando comparado ao genoma; além disso, ao nível celular as diferenças na abundância de proteínas variam muito tornando desafiador identificar proteínas com baixa abundância (GILMORE; WASHBURN, 2010; ZAPALSKA-SOZONIUK et al., 2019).

As principais etapas do estudo proteômico envolvem a preparação da amostra, separação e extração da amostra de proteína, detecção quantitativa e qualitativa da proteína, análise diferencial de proteínas por meio da bioinformática, verificação da expressão das proteínas, interferência na expressão de proteínas, verificação da função da proteína e mecanismos moleculares relacionados (CAO et al., 2020).

Basicamente a proteômica é dividida em duas abordagens: baseado em gel (*Top-down*) ou sem gel (*bottom-up* ou *shotgun*) (Figura 2). Na abordagem baseado em gel, usada para caracterizar proteínas intactas, a separação, fracionamento e expressão das proteínas será avaliada utilizando a eletroforese bidimensional e as proteínas individuais são digeridas com uma enzima, normalmente a tripsina, e identificadas usando espectrometria de massa (MS). Enquanto que na abordagem sem gel, usada para analisar peptídeos proteolíticos, os extratos de proteínas inteiras são digeridos com tripsina, separados por cromatografia e as proteínas de interesse identificadas e quantificadas usando instrumentos de MS de alto rendimento (ZHANG et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015). Ambas as abordagens são consideradas válidas e dependendo do objetivo podem se complementarem, embora a escolha final vai depender do tipo e quantidade de amostra, questão experimental específica, observações das modificações pós-tradicionais e metodologias disponíveis (MARCO-RAMELL et al., 2016).

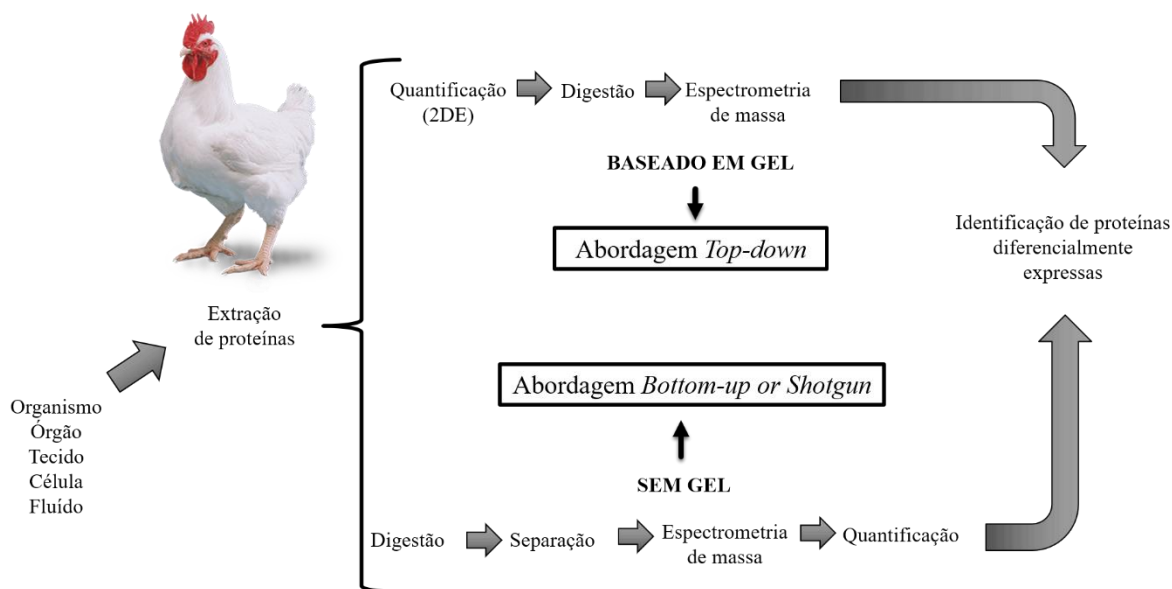


Figura 2. Principais abordagens proteômicas: baseado em gel e sem gel. Adaptado de Almeida et al. (2015).

1.5. Diferentes abordagens proteômicas: *2D-PAGE* e *Shotgun*

As diferentes metodologias proteômicas disponíveis possuem entre si objetivos comuns que estão relacionados com a exploração por diferenças entre dois ou mais conjuntos de amostras, ou seja, identificar proteínas diferencialmente expressas (positivamente ou negativamente) que serão caracterizadas e cujas funções estarão relacionadas a vias específicas (BASSOLS; BENDIXEN; MILLER, 2017).

Na eletroforese bidimensional em gel de poliácridamida (*2D-PAGE*), a separação e fracionamento das proteínas envolvem dois processos distintos, primeira e segunda dimensão. Na primeira dimensão (Focalização Isoelétrica – *IEF*) as amostras de proteínas são solubilizadas antes da separação em gradientes de pH imobilizados (*IPG*) de acordo com seus respectivos pontos isoelétricos (pI). Na segunda dimensão (Eletroforese em gel de poliácridamida – *SDS - PAGE*), o fracionamento das proteínas ocorre conforme a massa molecular através de géis de poliácridamida (acrilamida e bisacrilamida) de dodecil sulfato de sódio (detergente aniônico) que serve como uma peneira molecular na presença de uma corrida eletroforética (GILMORE; WASHBURN, 2010; LIPPOLIS; NALLY, 2018).

A presença dos *spots* proteicos no gel bidimensional (Figura 3) é visualizada por meio de métodos de coloração de proteínas, como por exemplo o azul de *Coomassie*. Este método de coloração é o mais utilizado pelo baixo custo, fácil manipulação, apresenta ampla faixa linear que auxilia na quantificação relativa e compatibilidade na análise por MS (NAIR; ZHAI, 2020). A análise do gel bidimensional envolve etapas como

digitalização, detecção e análise de imagem dos *spots* por meio de *softwares* específicos (exemplo, *Image Master Platinum* versão 7.0). Desta forma, o tratamento das imagens do gel analisados estatisticamente, segundo a porcentagem de volume normalizado e intensidade, permite mensurar parâmetros como número de *spots*, ponto isoelétrico, percentual de correlação (*matching*), massa molecular e expressão dos *spots* proteicos entre diferentes grupos. Posteriormente, as proteínas de interesse podem então ser excisadas dos géis, submetidas a digestão triptica (solução de tripsina), eluição dos peptídeos e identificadas por espectrometria de massas (KUNIYOSHI et al., 2019; BITTARELLO et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020; MALHEIROS et al., 2021).

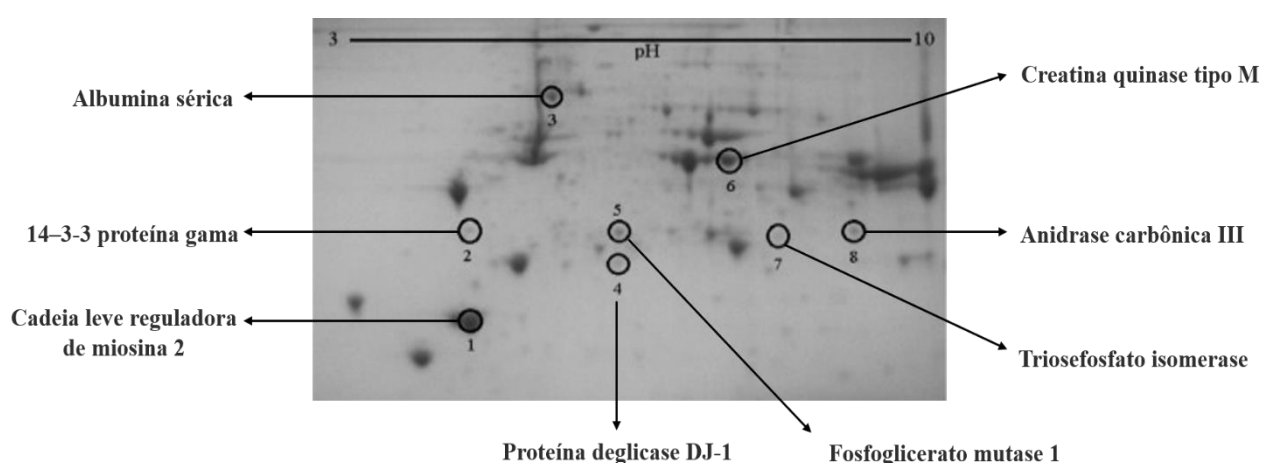


Figura 3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) do músculo *Pectoralis major* de frango. Fonte: Cai et al. (2018).

A técnica baseada sem gel (*shotgun* ou *bottom-up*) fornece uma medição indireta de proteínas por meio de peptídeos oriundos da digestão proteolítica de proteínas intactas (ZHANG et al., 2013). O rendimento da proteômica *shotgun* é superior a técnica 2D-PAGE devido a facilidade das técnicas de separação de proteínas por meio da cromatografia líquida. A capacidade de acoplar a cromatografia líquida capilar multidimensional (LC) à espectrometria de massa em tandem (MS/MS) torna essa abordagem reproduzível e capaz de separar e caracterizar peptídeos obtidos da digestão enzimática de uma amostra proteica (LIPPOLIS; NALLY, 2018; NAIR; ZHAI, 2020).

Ambas as técnicas demonstram pontos fortes e fracos quando observado pela perspectiva do método analítico. As vantagens da abordagem baseado em gel incluem melhor avaliação visual de amostras complexas, possibilita caracterizar isoformas de proteínas, determinação da massa molecular, ponto isoelétrico e modificações pós-tradicionais e análise de duas ou mais amostras simultaneamente, como por exemplo o

método *2D-DIGE* (eletroforese em gel de fluorescência bidimensional). No entanto, suas desvantagens são a falta de sensibilidade para detectar proteínas de baixa abundância (menor que 10 kDa), diferença na variação de gel para gel e sub-representação da análise de proteínas altamente ácidas/básicas. Por outro lado, na abordagem sem gel, as vantagens incluem a alta sensibilidade, facilidade de uso e repetibilidade, método acoplado ao *MS*, escolha de fracionamento e possibilita grandes conjuntos de dados. Porém, como desvantagens apresenta maiores custos e difícil determinação de modificação pós-tradução (LIPPOLIS; NALLY, 2018; NAIR; ZHAI, 2020).

De acordo com Jorin-Novo et al. (2019), a eletroforese em gel não está obsoleta, pelo contrário, é uma técnica válida e poderosa que embora possua potencialidades e limitações apresenta excelente abordagem complementar e alternativa que pode levar a uma visualização e conhecimento mais aprofundado do proteoma celular. Da mesma forma a proteômica *shotgun*, técnica mais atual, representa potencialidade na identificação de biomarcadores em diferentes tecidos (BOUDON et al., 2020). Estudos anteriores demonstraram que ambas técnicas validam resultados interessantes quando analisadas isoladamente, mas que possuem maior potencial quando analisadas em conjunto, ou seja, a complementariedade das técnicas *2D-PAGE* e *shotgun* podem indicar uma explicação mais completa de proteomas distintos (CEBALLOS-LAITA et al., 2018; GUGLIELMETTI et al., 2018; KIM; CHO, 2019).

1.6. Proteômica na produção animal

Nos animais de interesse zootécnico a proteômica ganhou relevância nos últimos anos pelo motivo de se mostrar como excelente ferramenta analítica confiável capaz de desvendar questões biológicas, veterinárias e zootécnicas, incluindo aspectos relacionados a qualidade de carne e identificação de biomarcadores em tecidos biológicos (ALMEIDA et al., 2015; DESAI et al., 2016; CAO et al., 2020; MOUZO et al., 2020; MALHEIROS et al., 2021).

Em pesquisas cujo objetivo principal é o efeito oriundo das influências via alimentação, metabolismo ou doenças, órgãos como fígado, músculo e intestino são os mais utilizados para estudos proteômicos, principalmente porque são órgãos que desempenham e participam de funções específicas do organismo (BASSOLS; BENDIXEN; MILLER, 2017).

O proteoma de determinado tipo de tecido animal é altamente variável em resposta à estimulação ambiental. Desta forma, a proteômica além de aprofundar em

conhecimentos relacionados a fisiologia e mecanismos bioquímicos, representa uma ferramenta eficaz para encontrar biomarcadores de proteínas do estresse (Figura 4), especialmente na produção animal (MOUZO et al., 2020). Normalmente, a identificação de biomarcadores relacionados ao estresse nos animais de interesse zootécnico (Figura 4) envolve etapas de qual método proteômico utilizar, a seleção de amostras (escolha do tecido biológico), extração de proteínas, separação, identificação, quantificação, verificação e análise de bioinformática (HUANG et al., 2020).

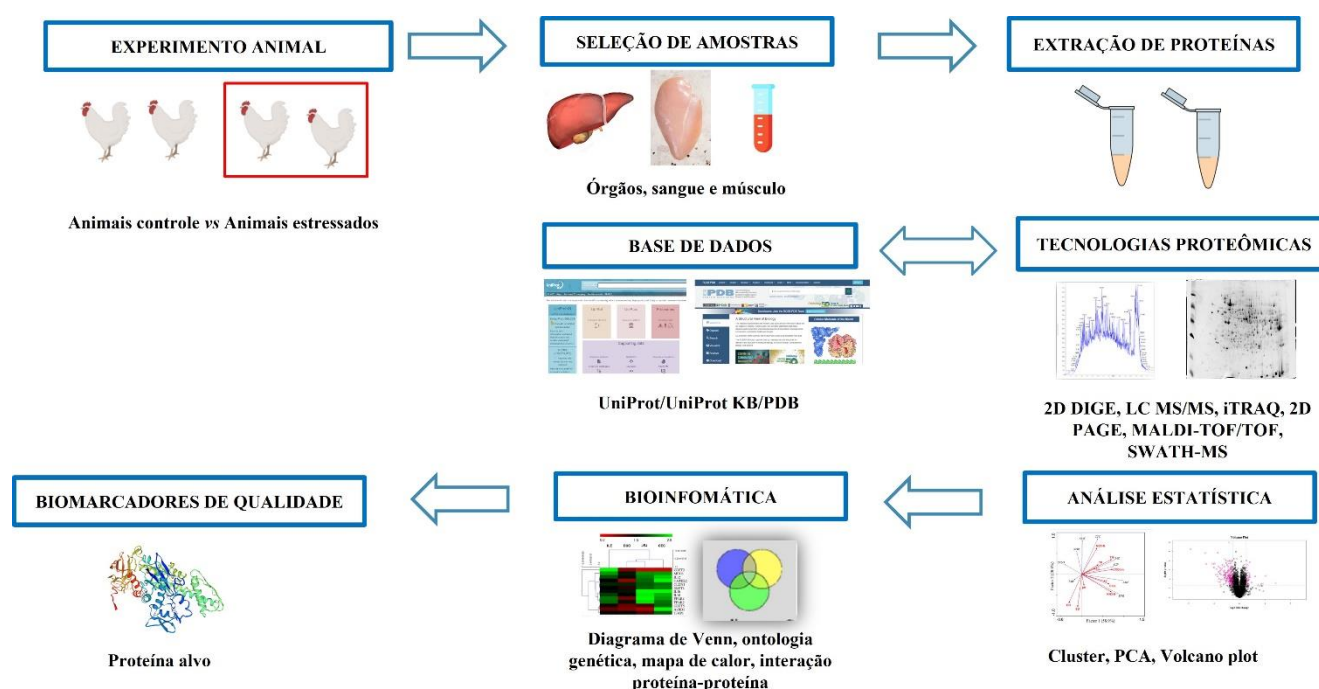


Figura 4. Fluxograma representando abordagem proteômica na investigação de biomarcadores de proteínas de estresse. Adaptado de Mouzo et al. (2020).

1.7. Abordagem proteômica do estresse térmico em frangos de corte

A carne de frango representa uma importante fonte de proteína para a nutrição humana e é consumida pela maioria da população como parte de uma dieta balanceada (BASSOLS; BENDIXEN; MILLER, 2017). De fato, a eficiência do frango de corte moderno observado nos últimos anos foi em decorrência dos avanços em pesquisas relacionados a nutrição, manejo, sanidade, seleção genética e ambiência (HAVENSTEIN; FERKET; QURESHI, 2003; CLARK; VELLEMAN, 2017). Entretanto, devido à ocorrência natural dos estressores ambientais, como altas temperaturas, os efeitos prejudiciais do estresse térmico na produção avícola ainda é um problema comum (LARA; ROSTAGNO, 2013; BELAL et al., 2018).

O estresse calórico é uma condição complexa que pode ocorrer ao longo das fases de vida dos animais. Entretanto, dependendo do tempo de exposição, o estresse térmico pode ocorrer de forma crônica (elevação da temperatura ambiente que pode variar de dias a semanas) ou aguda (elevação da temperatura ocorre de forma rápida e por um período curto de tempo) (ZHENG et al., 2021). De acordo com Abdelnour et al. (2019), ambos tipos de estresse são capazes de estimular vários tipos de respostas bioquímicas, fisiológicas e imunológicas, como depressão das funções imunes e endócrinas, alterações dos aminoácidos sanguíneos, redução na biodisponibilidade de energia celular, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), com subsequente indução de danos oxidativos a lipídeos, proteínas, DNA e reduções das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, glutathione peroxidase – GPx) e aumento nas concentrações de malondialdeído (MDA).

Nas aves o estresse por calor interfere de forma negativa no sistema antioxidante, uma vez que a peroxidação lipídica nos tecidos se eleva gerando acúmulo de radicais livres. Este acúmulo favorece alterações na célula e, conseqüentemente, diminuição no desempenho zootécnico e deterioração da qualidade da carne (MAINI et al., 2007). Além disso, as condições de estresse por calor afetam os parâmetros fisiológicos e imunológicos em frangos de corte, ocasionando maiores danos histopatológicos nos tecidos cerebral, muscular e cardíaco (XU et al., 2018). Em linhagens de frangos de corte de crescimento rápido quando submetidos ao estresse calórico, respostas transcriptômicas e metabolômicas hepáticas demonstraram efeitos prejudiciais relacionados ao ciclo celular, reparo de DNA, funções imunológicas, níveis alterados de glicose, lipídeos, aminoácidos, glutathione e do sistema endocanabinóide (JASTREBSKI; LAMONT; SCHMIDT, 2017).

As adaptações fisiológicas do animal em relação ao estresse térmico depende da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso ortossimpático, bem como da expressão de proteínas relacionadas ao estresse (ZENG et al., 2013; TANG et al., 2015), os quais se manifestam em mudanças moleculares nos níveis genômico, transcriptômico, metabolômico e proteômico (JASTREBSKI; LAMONT; SCHMIDT, 2017). No nível molecular, uma resposta significativa ao estresse térmico é o aumento da expressão dos genes das proteínas de choque térmico (*HSPs*) que codificam as chaperonas moleculares responsáveis pela estabilização das estruturas das proteínas em temperaturas altas (FEDER; HOFMANN, 1999; BELAL et al., 2018). As *HSPs* exercem funções importantes no crescimento, desenvolvimento, diferenciação e síntese de proteínas

(DAVENPORT et al., 2014), além de desempenharem função reguladora em resposta ao estresse tanto nos tecidos quanto nas células dos animais (XU et al., 2018).

Como alternativa para redução dos efeitos prejudiciais que o estresse térmico proporciona na avicultura industrial desde a diminuição do crescimento até a menor qualidade da carne, estratégias nutricionais vêm sendo adotadas com o intuito de promover melhor produção e bem-estar animal, dando ênfase, principalmente aos alimentos naturais que possuem substâncias antioxidantes nas dietas (BRENES; ROURA, 2010; PLACHA et al., 2014; ZHAI et al., 2018). Hosseini, Farhangfar e Nourmohammadi (2018), observaram menor expressão dos genes *HSP70* no cérebro e coração quando suplementaram uma mistura de óleos essenciais provenientes dos extratos vegetais (canela e tomilho), nas dietas dos frangos submetidos a alta densidade populacional (20 aves/m²). Desta forma, como indicado neste estudo, o uso de extratos vegetais pode auxiliar no aumento da tolerância em condições estressantes e a proteger contra danos oxidativos em aves domésticas.

A busca por biomarcadores de estresse ainda é um desafio para a produção animal, principalmente devido a inespecificidade da resposta. Marcadores de estresse hormonal como adrenalina, cortisol e corticosterona são medidas comumente utilizadas para avaliarem o nível de estresse, mas possuem meia-vida curta e variabilidade intra e interindividual muito alta (MARCO-RAMELL et al., 2016; BASSOLS; BENDIXEN; MILLER, 2017). Essas desvantagens dificultam na identificação do estresse. Entretanto, abordagens proteômicas podem explorar as especificidades de cada condição e auxiliar na compreensão dos perfis proteômicos da espécie animal (Tabela 1).

Os efeitos do estresse térmico em diferentes órgãos (fígado, hipotálamo, testículo, baço e músculo) no proteoma das aves utilizando diferentes abordagens proteômicas demonstraram redução significativa nos processos celulares, nas vias metabólicas, respostas imunes e estresse oxidativo em condições de calor (Tabela 1). Estes órgãos possuem menor pesos relativos quando submetidos ao estresse por calor e foram avaliadas por meio de estudos proteômicos. O hipotálamo exerce função importante como centro para regular a retenção ou dissipação de calor e perante estresse térmico, após análise *2D-DIGE*, a maioria das proteínas estavam envolvidas em processos celulares, metabolismo, transporte e organização de componentes celulares, resultando em estresse oxidativo e degradação proteínas mal dobradas (TU et al., 2018). Além disso, a análise proteômica baseada em *iTRAQ* no baço de aves submetidas ao estresse térmico, o qual representa o maior órgão do sistema imunológico periférico e a principal localização da resposta

imune inata das aves, revelou que várias vias de sinalização estão envolvidas com a imunidade inata e que várias proteínas estão relacionadas à morte celular, incluindo apoptose, necroptose e ferroptose (MA et al., 2019).

Tang et al. (2015) ao estudarem o proteoma do tecido hepático em frangos de corte submetidos ao estresse térmico, identificaram 257 proteínas expressas diferencialmente, das quais estavam envolvidas principalmente na tradução de proteínas, no processo de oxirredução, enovelamento de proteínas, transdução de sinal e na regulação negativa de processos apoptóticos. Segundo os autores, essas proteínas podem inibir as vias de sinalização das proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (*ERK*), afetarem o metabolismo lipídico e de aminoácidos no fígado das aves e induzir respostas inflamatórias e imunes das células hepáticas quando submetidos a altas temperaturas ambientais. A compreensão dos genes e proteínas que respondem ao calor é, portanto, fundamental para entender melhor os mecanismos moleculares subjacentes à tolerância ao estresse, no qual o fígado pode ser responsável pelas respostas devido desempenhar função importante na manutenção do metabolismo, digestão e defesa imunológica do organismo (ZENG et al., 2013; ZHANG et al., 2015; ZHENG et al., 2016).

Outros mecanismos para lidarem com o estresse térmico em aves foram relatados por Zhang et al. (2021), por meio da maior expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo da glutathione na tentativa de lidar com o dano oxidativo e redução da expressão de proteínas relacionadas com a via do ciclo do ácido tricarboxílico e Zeng et al. (2013), em que a resposta ao estresse térmico foi o aumento das proteínas chaperonas (*HSP70*, *HSP10*), α -enolase e S- adenosilmetionina sintetase, regulação do metabolismo de aminoácidos, morte celular, apoptose e redução da oxidação para enfrentarem altas temperaturas. Outra perspectiva para enfrentar o estresse por calor foi proposto por Kang e Shim (2020) mediante abordagem proteômica. Segundo os autores, a exposição precoce ao calor no início de vida das aves pode aumentar a resistência contra o estresse por calor em idades mais avançadas. A análise proteômica sugeriu que as proteínas expressas diferencialmente estavam envolvidas no metabolismo de actina, carboidratos e carbono, demonstrando que o fígado possui vários mecanismos fisiológicos para regular a homeostase e auxiliar na resistência ao calor (KANG; SHIM, 2020).

Altas temperaturas ambientais ocasionam danos oxidativos e redução da qualidade da carne em aves. Abordagens proteômicas revelaram que o estresse térmico influencia o estado oxidativo no músculo eliminando as funções mitocondriais e das cadeias respiratórias, e que proteínas como ATPases de cálcio do retículo

sarcoplasmático/ endoplasmático, superóxido dismutase - Mn, proteína de choque térmico membro da família B7, metiltransferase (21C), proteína C de ligação à miosina e anidrase carbônica 3 podem atuar como possíveis proteínas protetoras envolvidas nos mecanismos de defesa (HE et al., 2019). Além disso, a expressão diferencial de proteínas envolvidas na via da glicólise, sinalização de cálcio e chaperonas musculares podem contribuir na elucidação da qualidade da carne bem como na identificação de biomarcadores de estresse (XING et al., 2017).

O estresse térmico também causa diminuição da fertilidade em galos. O perfil de proteínas expressas nos testículos de frangos sob estresse térmico, por meio de análise *2D-DIGE*, demonstraram que as proteínas diferencialmente expressas atuaram no metabolismo de proteínas, organização celular, resposta a estímulos e afetaram os processos de tradução e dobramento de proteínas, resultando em apoptose e interferindo na espermatogênese. Além disso, o aumento da expressão das proteínas de choque térmico (*HSP90α*, *HSPA5* e *HSPA8*) e enzimas antioxidantes (*glutathione S-transferase* e *DJ-1*) podem amenizar a lesão testicular induzida pelo estresse térmico agudo (WANG et al., 2014, 2018).

Tabela 1. Efeitos do estresse térmico por calor no proteoma de aves utilizando diferentes métodos proteômicos.

Fontes de estresse	Amostra proteômica	Método proteômico	Efeitos no proteoma	Referência
Estresse térmico agudo (38°C/2h)	Hipotálamo	2D-DIGE	A maioria das proteínas expressas diferencialmente estava envolvida em processos celulares, metabolismo, transporte e organização de componentes celulares	Tu et al. (2018)
Estresse por calor (31°C/14 dias)	Baço	iTRAQ	09 proteínas menos expressas relacionadas à imunidade inata e 06 proteínas menos ou mais expressas relacionadas à morte celular	Ma et al. (2019)
Estresse térmico no transporte	Músculo peitoral	iTRAQ	A via da glicólise, sinalização de cálcio e chaperonas moleculares exibiram diferenças significativas	Xing et al. (2017)
Estresse por calor (32°C/72h)	Fígado	SWATH-MS	Foi inibida a via de sinalização da <i>ERK</i> , afetou o metabolismo de lipídios e aminoácidos e induziu respostas imunes às células hepáticas	Tang et al. (2015)
Estresse por calor (32°C/8h)	Músculo peitoral	SDS-PAGE, RPLC e TMT	Supressão das funções mitocondriais e das cadeias respiratórias (maior oxidação) e possíveis proteínas protetoras contra o estresse térmico	He et al. (2019)
Estresse térmico precoce (40°C/24h)	Fígado	LC-MS/MS	Expressão diferencial de proteínas foram relacionadas ao metabolismo de actina, carboidratos e carbono	Kang e Shim (2020)
Estresse térmico crônico (38°C/8h)	Fígado	iTRAQ	Maior expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo da glutatona e menor expressão de proteínas relacionadas com o ciclo do ácido tricarboxílico	Zhang et al. (2021)
Estresse térmico agudo (38°C/4h)	Testículo	2D-DIGE	Proteínas diferencialmente expressas relacionadas com processos de tradução, dobramento e degradação, resultando em apoptose e interferindo na espermatogênese	Wang et al. (2014)
Estresse térmico agudo (38°C/4h)	Testículo	2D-DIGE	Proteínas menos expressas foram relacionadas com a apoptose e as proteínas mais expressas foram relacionadas com a autofagia e com as proteínas de choque térmico (HSP90α, HSPA5 e HSPA8)	Wang et al. (2018)
Estresse térmico agudo (39°C/1h)	Fígado	2D-PAGE	Proteínas expressas positivamente: HSP70, HSP10, α-enolase e S- adenosilmetionina sintetase.	Zeng et al. (2013)

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, não há relatos na literatura científica sobre a realização de abordagens proteômicas (*2D-PAGE/LC-MS/MS* e *Shotgun (gel free)/LC-MS/MS*) para elucidar o efeito da suplementação do OSM nas mudanças de expressão de proteínas no tecido hepático e muscular de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. Portanto, o presente trabalho tem o propósito de compreender e fornecer possíveis mecanismos moleculares que a suplementação do OSM pode exercer sobre o metabolismo dos frangos de corte em resposta ao estresse calórico, bem como possíveis associações com a nutrição e metabolismo das aves. O tecido hepático e muscular são órgãos que desempenham e participam de funções específicas no organismo animal, desta forma, as mudanças nos valores de expressão das proteínas nesses tecidos, principalmente quando o efeito são influências via alimentação ou um desafio estressante, podem demonstrar uma visão holística nos processos celulares, nas vias metabólicas, respostas imunes e estresse oxidativo.

3. OBJETIVO

A presente tese compõe a identificação, expressão e compreensão do proteoma hepático e muscular de frangos de corte suplementados com OSM sob condições de estresse cíclico por calor. A fim de atender os objetivos propostos, a tese foi dividida em dois capítulos principais:

O capítulo 2, intitulado “**Óleo da semente de maracujá na dieta de frangos de corte altera o proteoma hepático em condições de estresse cíclico por calor**”, será submetido a revisão por pares de acordo com as normas editoriais do periódico *International Journal of Biological Macromolecules* (JCR 2021: 8.025). O objetivo deste estudo é caracterizar as proteínas diferencialmente expressas, utilizando como abordagem proteômica a *2D-PAGE/LC-MS/MS*, no tecido hepático de frangos de corte suplementados com OSM sob condições de estresse cíclico por calor.

O capítulo 3, intitulado “**Proteômica shotgun revela alterações no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com óleo da semente de maracujá sob condições de estresse cíclico por calor**”, será submetido a revisão por pares conforme as normas editoriais do periódico *Food Chemistry* (JCR 2021: 9.231). O objetivo deste estudo é caracterizar as proteínas diferencialmente expressas, utilizando como estratégia proteômica a *Shotgun (gel free)*, no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com OSM em condições de estresse cíclico por calor.

REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, S. A. et al. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. **Journal of Thermal Biology**, v. 79, n. September 2018, p. 120–134, 2019.
- ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 3, p. 403–12, 2005.
- ALMEIDA, A. M. et al. Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, v. 9, p. 1–17, 2015.
- ALTENDORF, S. Minor tropical fruits - Mainstreaming a niche market. In: FAO (Ed.). . **Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets**. July ed. [s.l.] FAO, 2018. p. 67–74.
- AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, p. 1866–1874, 2011.
- BALDASSINI, W. A. et al. Proteomic investigation of liver from beef cattle (*Bos indicus*) divergently ranked on residual feed intake. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 6, p. 2765–2773, 2018.
- BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; MILLER, I. From Farm to Fork: Proteomics in Farm Animal Care and Food Production. In: COLGRAVE, M. L. (Ed.). . **Proteomics in Food Science: From Farm to Fork**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 145–161.
- BELAL, S. et al. Taurine Reduces Heat Stress by Regulating the Expression of Heat Shock Proteins in Broilers Exposed to Chronic Heat. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 3, p. 479–486, 2018.
- BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273–281, 2003.
- BITTARELLO, A. C. et al. Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134547, 2020.

BOUDON, S. et al. Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers. **Journal of Proteomics**, v. 217, n. January, p. 103685, 2020.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1–2, p. 1–14, 2010.

CAI, K. et al. Meat quality traits and proteome profile of woody broiler breast (pectoralis major) meat. **Poultry Science**, v. 97, p. 337–346, 2018.

CAO, C. et al. Application and Research Progress of Proteomics in Chicken Meat Quality and Identification: A Review. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–22, 2020.

CEBALLOS-LAITA, L. et al. Effects of manganese toxicity on the protein profile of tomato (*Solanum lycopersicum*) roots as revealed by two complementary proteomic approaches, two-dimensional electrophoresis and shotgun analysis. **Journal of Proteomics**, v. 185, n. May, p. 51–63, 2018.

CLARK, D. L.; VELLEMAN, S. G. Spatial influence on breast muscle morphological structure, myofiber size, and gene expression associated with the wooden breast myopathy in broilers. **Poultry Science**, v. 95, p. 2930–2945, 2017.

COMMISSION, C. A. **Standard for named vegetable oils** Codex Alimentarius - **International Food Standards** FAO, , 2019.

CORRÊA, R. C. G. et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science and Technology**, v. 58, p. 79–95, 2016.

DAVENPORT, J. et al. High-Throughput Screen of Natural Product Libraries for Hsp90 Inhibitors. **Biology**, v. 3, n. 1, p. 101–138, 2014.

DEMBITSKY, V. M. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671–1701, 2011.

DESAI, M. A. et al. Proteome basis of pale, soft, and exudative-like (PSE-like) broiler breast (*Pectoralis major*) meat. **Poultry Science**, v. 95, n. 11, p. 2696–2706, 2016.

EMBRAPA. **Extração do óleo da semente de maracujá** Relatório de Avaliação dos

Impactos das Tecnologias Geradas pela Embrapa. Rio de Janeiro: [s.n.].

FACHINELLO, M. R. et al. Nutritional evaluation of passion fruit seed meal for meat quails. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 2, p. 202–213, 2016.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, p. 243–82, 1999.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101–102, 2004.

GILMORE, J. M.; WASHBURN, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2078–2091, 2010.

GONG, J. et al. Review: Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: Potential and challenges in application. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 94, p. 223–241, 2014.

GUGLIELMETTI, C. et al. Two-dimensional gel and shotgun proteomics approaches to distinguish fresh and frozen-thawed curled octopus (*Eledone cirrhosa*). **Journal of Proteomics**, v. 186, n. July, p. 1–7, 2018.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Growth, Livability, and Feed Conversion of 1957 Versus 2001 Broilers Diets. **Poultry Science**, v. 82, p. 1500–1508, 2003.

HE, J. et al. Proteomic responses to oxidative damage in meat from ducks exposed to heat stress. **Food Chemistry**, v. 295, n. May, p. 129–137, 2019.

HOSSEINI, S. M.; FARHANGFAR, H.; NOURMOHAMMADI, R. Effects of a blend of essential oils and overcrowding stress on the growth performance, meat quality and heat shock protein gene expression of broilers. **British Poultry Science**, v. 59, n. 1, p. 92–99, 2018.

HUANG, C. et al. Proteomics discovery of protein biomarkers linked to meat quality traits in post-mortem muscles: Current trends and future prospects: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, n. December 2019, p. 416–432, 2020.

JANZANTTI, N. S.; MONTEIRO, M. Changes in the aroma of organic passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) during ripeness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 612–620, 2014.

JASTREBSKI, S. F.; LAMONT, S. J.; SCHMIDT, C. J. Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1–15, 2017.

JORRIN-NOVO, J. V. et al. Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics! **Journal of Proteomics**, v. 198, n. June 2018, p. 1–10, 2019.

KANG, D. R.; SHIM, K. S. Proteomic analysis of the protective effect of early heat exposure against chronic heat stress in broilers. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2020.

KHUWIJITJARU, P.; KLINCHONGKON, K. Passion fruit. In: GALANAKIS, C. M. (Ed.). **Valorization of Fruit Processing By-products**. Chennai: Academic Press, 2020. p. 183–201.

KIM, Y. I.; CHO, J. Y. Gel-based proteomics in disease research: Is it still valuable? **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 1, p. 9–16, 2019.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

KUNIYOSHI, M. L. G. et al. Proteomic analysis of the fast-twitch muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after prolonged fasting and compensatory growth. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 30, p. 321–332, 2019.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 356–369, 2013.

LEÃO, K. M. M. et al. Odor potency, aroma profile and volatiles composition of cold pressed oil from industrial passion fruit residues. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 280–286, 2014.

LIPPOLIS, J. D.; NALLY, J. E. Considerations for Farm Animal Proteomic Experiments: An Introductory View Gel-Based Versus Non-gel-Based Approaches. In: ALMEIDA, A.

M. DE; ECKERSALL, D.; MILLER, I. (Eds.). . **Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology**. Cham: Springer, 2018. p. 7–16.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Passion fruit seed: Its antioxidative extracts and potency in protection of skin aging. In: PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. (Eds.). . **Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 283–288.

MA, D. et al. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of the spleen reveals innate immunity and cell death pathways associated with heat stress in broilers (*Gallus gallus*). **Journal of Proteomics**, v. 196, n. September 2018, p. 11–21, 2019.

MAINI, S. et al. Evaluation of oxidative stress and its amelioration through certain antioxidants in Broilers during summer. **The Journal of Poultry Science**, v. 44, p. 339–347, 2007.

MALHEIROS, J. M. et al. Application of proteomic to investigate the different degrees of meat tenderness in Nellore breed. **Journal of Proteomics**, v. 248, n. August 2020, p. 104331, 2021.

MARCO-RAMELL, A. et al. Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 7, p. 2024–2035, 2016.

MENTEN, J. F. M. et al. Antibióticos, Ácidos Orgânicos e Óleos Essenciais na Nutrição de Monogástricos. In: SAKOMURA, N. K. et al. (Eds.). . **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. p. 511–535.

MOUZO, D. et al. Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 99, n. March, p. 520–530, 2020.

NAIR, M. N.; ZHAI, C. Application of proteomic tools in meat quality evaluation. In: BISWAS, A. K.; MANDAL, P. K. (Eds.). . **Meat Quality Analysis: Advanced Evaluation Methods, Techniques, and Technologies**. Chennai: Academic Press, 2020. p. 353–368.

OLIVEIRA, C. M. DE; FRIZZAS, M. R. Principais Pragas do Maracujazeiro Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) e Seu Manejo. **Empresa Brasileira de Pesquisa**

Agropecuária Embrapa Amazônia Oriental Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, v. 323, p. 1–43, 2014.

OLIVEIRA, L. F. DE et al. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259–262, 2002.

PEREIRA, D. DE A.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. DE. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of “somnus” passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 12–21, 2015.

PLACHA, I. et al. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. **British Poultry Science**, v. 55, n. 1, p. 105–114, 2014.

QIU, W. et al. Combined Analysis of Transcriptome and Metabolome Reveals the Potential Mechanism of Coloration and Fruit Quality in Yellow and Purple *Passiflora edulis* Sims. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 43, p. 12096–12106, 2020.

QUEIROZ, J. V. DE et al. Metalloproteomic Strategies for Identifying Proteins as Biomarkers of Mercury Exposure in *Serrasalmus rhombeus* from the Amazon Region. **Biological Trace Element Research**, 2020.

SCHILLING, M. W. et al. Proteomic approach to characterize biochemistry of meat quality defects. **Meat Science**, v. 132, p. 131–138, 2017.

SILVA, A. C. DA; JORGE, N. Bioactive compounds of oils extracted from fruits seeds obtained from agroindustrial waste. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 4, p. 1–5, 2016.

SILVA, J. K. DA et al. Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel increases colonic production of short-chain fatty acids in Wistar rats. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P2, p. 1252–1257, 2014.

TANG, X. et al. Label-free Quantitative Analysis of Changes in Broiler Liver Proteins under Heat Stress using SWATH-MS Technology. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 1–15, 2015.

TOGASHI, C. K. et al. Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte

alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2063–2068, 2007.

TOGASHI, C. K. et al. Subprodutos do maracujá em dietas para frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 395–400, 2008.

TORRES, O. P. N. et al. Effects of the Different Levels of Flour (*Passiflora edulis*), the European and Economic Efficiency Index on Performance of the Cobb 500 Chickens. **EC Veterinary Science**, v. 1, p. 49–56, 2019.

TRAESEL, C. K. et al. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 278–284, 2011.

TU, W. L. et al. Proteomic analysis of the hypothalamus of broiler-type Taiwan country chickens in response to acute heat stress. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 10, p. 1475–1485, 2018.

VUOLO, M. M. et al. Passion fruit peel intake decreases inflammatory response and reverts lipid peroxidation and adiposity in diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 76, p. 106–117, 2020.

WANG, S. H. et al. Changes in protein expression in testes of L2 strain Taiwan country chickens in response to acute heat stress. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 80–94, 2014.

WANG, S. H. et al. Acute Heat Stress Changes Protein Expression in the Testes of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens. **Animal Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 129–145, 2018.

WANG, Y. et al. Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2012.

WIJERATNAM, S. W. **Passion Fruit**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016.

WILHELM, A. E. et al. Diferentes taxas de alimentação de prensa do tipo expeller na eficiência de extração e na qualidade do óleo de semente de maracujá. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1312–1318, 2014.

XING, T. et al. Proteome Analysis Using Isobaric Tags for Relative and Absolute

Analysis Quantitation (iTRAQ) Reveals Alterations in Stress-Induced Dysfunctional Chicken Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 13, p. 2913–2922, 2017.

XU, Y. et al. Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. **Poultry Science**, v. 97, n. 11, p. 4073–4082, 2018.

ZANETTI, L. H. et al. By-product of passion fruit seed (*Passiflora edulis*) in the diet of commercial laying hens. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 494, p. 488–494, 2016.

ZANETTI, L. H. et al. By-Product Of Passion Fruit Seed (*Passiflora Edulis*) In The Diet of Broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 98, p. 109–118, 2017.

ZAPALSKA-SOZONIUK, M. et al. Is it useful to use several “omics” for obtaining valuable results? **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 3, p. 3597–3606, 2019.

ZENG, T. et al. Comparative Proteomic Analysis of the Hepatic Response to Heat Stress in Muscovy and Pekin Ducks: Insight into Thermal Tolerance Related to Energy Metabolism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: Um alimento funcional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 459–471, 2010.

ZHAI, H. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 179–186, 2018.

ZHANG, J. et al. High concentrations of atmospheric ammonia induce alterations in the hepatic proteome of broilers (*Gallus gallus*): An iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2015.

ZHANG, Q. et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analyses the cycle chronic heat stress affecting liver proteome in yellow-feather chickens. **Poultry Science**, v. 100, n. 6, p. 101111, 2021.

ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013.

ZHANG, Y. et al. Alginate-whey protein dry powder optimized for target delivery of

essential oils to the intestine of chickens. **Poultry science**, v. 93, p. 2514–2525, 2014.

ZHENG, A. et al. Molecular differences in hepatic metabolism between AA broiler and big bone chickens: A proteomic study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–20, 2016.

ZHENG, H. T. et al. Effects of acute heat stress on protein expression and histone modification in the adrenal gland of male layer-type country chickens. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.

CAPÍTULO 2

**Óleo da semente de maracujá na dieta de frangos de corte altera o proteoma
hepático em condições de estresse cíclico por calor**

Artigo redigido de acordo com as normas adaptadas do periódico “*International Journal
of Biological Macromolecules*” (JCR 2021: 8.025)

Óleo da semente de maracujá na dieta de frangos de corte altera o proteoma hepático em condições de estresse cíclico por calor

RESUMO

O objetivo com o presente estudo foi investigar o efeito da suplementação do óleo da semente de maracujá (OSM) sobre o perfil diferencial de proteínas expressas no tecido hepático de frangos de corte submetidos ao estresse cíclico por calor. 225 pintainhos machos de 1 dia de idade foram alojados em gaiolas dispostas em câmara climática onde foram mantidos sob estresse cíclico por calor durante oito horas por dia do início ao final do experimento. Foram formuladas cinco dietas experimentais a base de milho e farelo de soja, sendo uma dieta controle (sem adição de OSM) e quatro dietas nas quais foram realizadas a inclusão de diferentes níveis de OSM (0,30; 0,50; 0,70 e 0,90%). Aos 36 dias de idade, nove aves de cada tratamento foram abatidas para coleta das amostras de fígado. A partir de *pools* das amostras de fígado de cada tratamento, foi realizado o fracionamento do proteoma hepático por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e caracterização das proteínas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). A suplementação de 0,90% de OSM aumentou a expressão de sete proteínas de choque térmico, enquanto foi observado menor expressão de seis proteínas antioxidantes. Proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e de carboidratos também apresentaram alterações na expressão. Estes resultados sugerem que a suplementação de OSM influencia positivamente a ativação de mecanismos de reparação dos danos provocados pela exposição cíclica ao calor por meio do aumento da expressão das chaperonas moleculares no tecido hepático.

Palavras-chave: 2D-PAGE, estresse por calor, proteínas de choque térmico

1. Introdução

O processamento em larga escala do maracujá (*Passiflora* spp.) pela indústria fornece grandes quantidades de resíduos, principalmente cascas e sementes, representando 65 a 70% do peso do fruto (Ferrari et al., 2004; Oliveira et al., 2002). Esses resíduos geralmente descartados possuem compostos bioativos importantes que promovem a saúde e que podem ser considerados constituintes atrativos para a produção de alimentos funcionais (Qiu et al., 2020; Silva et al., 2014).

Pesquisas anteriores verificaram que os resíduos da semente de maracujá podem indicar o potencial do fruto como alimento funcional nas dietas de frangos de corte e poedeiras comerciais (Zanetti et al., 2016, 2017). Os resíduos da semente de maracujá possuem elevado teor de óleo em sua composição, contendo tocoferóis, carotenóides, fenólicos e fitoesteróis (Ayala-Zavala et al., 2011; Dembitsky et al., 2011). Estes compostos bioativos presentes no óleo da semente de maracujá (OSM) demonstraram alta capacidade para atuarem como antioxidante natural e auxiliarem na prevenção de danos causados pela oxidação lipídica (Silva e Jorge, 2016).

A ocorrência natural dos estressores ambientais, principalmente temperaturas elevadas, continua sendo um dos fatores responsáveis pelo estresse térmico que afeta a eficiência no desempenho produtivo, reprodutivo, fisiológico, imunológico e bem-estar na avicultura industrial (Lara e Rostagno, 2013; Saeed et al., 2019). O estresse térmico dependendo do tipo de exposição, agudo ou crônico, pode desencadear alterações dos aminoácidos sanguíneos, depressão das funções imunes e endócrinas, redução da energia celular, aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS), indução de danos oxidativos a lipídeos, proteínas, DNA e redução das enzimas antioxidantes (Abdelnour et al., 2019; Jastrebski et al., 2017; Zheng et al., 2021).

Como estratégia para mitigar os efeitos deletérios que o estresse térmico provoca na produção avícola e compreender de forma abrangente os mecanismos moleculares e as adaptações fisiológicas manifestadas em nível proteômico, alimentos naturais que possuem substâncias antioxidantes podem ser utilizados nas dietas de frangos de corte sob condições de estresse térmico (Tang et al., 2018; Yang et al., 2021). Desta forma, a eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE) e a espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS) podem ser utilizadas para melhor caracterização a nível molecular (Baldassini et al., 2018; Kang e Shim, 2020; Zeng et al., 2013). Nas pesquisas científicas onde o efeito principal é a influência da alimentação e/ou aplicação de uma situação de estresse, órgãos como fígado, são particularmente

importantes em estudos proteômicos porque desempenham funções específicas no organismo animal. O fígado desempenha função central na manutenção do metabolismo geral do organismo, incluindo síntese de proteínas, lipídeos, desintoxicação e regulação do metabolismo energético nas aves (Jastrebski et al., 2017; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2021; Zheng et al., 2016).

Até o momento, nenhum estudo utilizou abordagens proteômicas (2D-PAGE/LC-MS/MS) para verificar o efeito da suplementação do óleo da semente de maracujá (OSM) nas mudanças de expressão de proteínas no tecido hepático de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. Portanto, o objetivo deste estudo é caracterizar as proteínas diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de corte suplementados com OSM em condições de estresse cíclico por calor.

2. Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – SP, sob o protocolo 0106/2019 de acordo com as normas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

2.1. Animais, tratamentos, delineamento experimental e coleta das amostras

Foram utilizados 225 pintinhos de 1 dia de idade, machos, da linhagem Cobb® 500, alojados em gaiolas de arame galvanizado (0,4 x 0,5 x 0,6m) com comedouros tipo calha dispostos frontalmente a gaiola e bebedouros tipo *nipple*, totalizando 45 gaiolas. Todas as aves foram vacinadas no incubatório contra Gumboro, Marek e Bouba Aviária. A água e ração foram fornecidas à vontade durante o período experimental e o programa de luz foi de acordo com as orientações do manual da linhagem. As aves foram mantidas do início ao final do período experimental em câmara climática sob estresse cíclico por calor mantido por 08 horas por dia, e as temperaturas utilizadas (Tabela 1) foram baseadas e adaptadas de acordo com Zeferino et al. (2016).

As dietas experimentais foram formuladas a base de milho e farelo de soja, segundo as recomendações de Rostagno et al. (2017) para frangos de corte machos de desempenho médio (Tabela 2), com cinco níveis de inclusão de óleo da semente de maracujá (OSM): 0 (Controle); 0,30; 0,50; 0,70 e 0,90% - OSM, sendo nove repetições de cinco aves cada, totalizando cinco tratamentos. A ração experimental foi desprovida

de antibióticos como melhorador de desempenho, sendo utilizado anticoccidiano em todos os tratamentos. O programa de alimentação foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 33 dias) e final (34 a 42 dias de idade).

Tabela 1. Temperaturas médias registradas na câmara climática sob estresse cíclico por calor durante o período experimental.

Idade das aves (dias)	Temperatura (°C)
1-7	35,26
8-21	33,08
22-35	31,54
36-42	30,01

Aos 36 dias de idade, os animais foram identificados individualmente e após jejum de oito horas as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical. Após abate, amostras de fígado de 45 frangos (nove animais/grupo) foram coletadas imediatamente e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C até a análise proteômica. Para reduzir as diferenças individuais entre as aves de cada tratamento, foram feitos cinco *pools* a partir da homogeneização de amostras de fígado de nove animais por tratamento, em que cada *pool* corresponde a um grupo experimental.

2.2. Preparação da amostra: extração, precipitação e quantificação das proteínas

Para o processo de extração das proteínas das amostras 400 mg dos *pools* de fígado foram macerados com almofariz e pilão na presença de nitrogênio líquido. Posteriormente, foi adicionado solução extratora (água ultrapura) na proporção de 400 mg de tecido para 2 mL de água ultrapura. Em seguida, toda mistura foi transferida para microtubos de 2 mL e centrifugados a 10.000 *rpm* (15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e as proteínas foram precipitadas com acetona gelada 80% (v/v) na proporção de 200 µL de sobrenadante para 400 µL de acetona. Após repouso de 1,5 h a 4°C, as amostras foram centrifugadas novamente durante 15 min a 10.000 *rpm* e o sobrenadante foi descartado sendo obtidos os *pellets* proteicos para eletroforese em gel bidimensional. Os *pellets* proteicos foram solubilizados em NaOH 0,50 mol/L⁻¹ para determinação da concentração de proteína total conforme método de biureto (Itzhaki e Gill, 1964), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Uma curva de calibração foi construída com faixa de concentração de 0-100 gL⁻¹ de solução padrão de albumina bovina na concentração de 100 g L⁻¹.

2.3. Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)

Após precipitação das proteínas a separação 2D-PAGE seguiu conforme protocolo descrito por Braga et al. (2017). Os *pellets* proteicos foram solubilizados em solução contendo 7 mol L⁻¹ de ureia; 2 mol L⁻¹ tioureia, 2% (p/v) CHAPS (3 - [(3-colamidopropil) -dimetilamônio] -1-propanossulfonato), 0,5% (v/v) de anfólitos (pH variando de 3 a 10), 0,002% (p/v) de azul de bromofenol e 2,8 mg de ditioneitol (DTT) para utilização nas corridas eletroforéticas. Alíquotas de 250 µL (equivalente a 375 µg de proteína) das soluções dos *pellets* proteicos foram aplicadas em fitas de 13 cm contendo gel pré-fabricado e anfólitos imobilizados com gradientes de pH 3 a 10, utilizando o sistema de focalização isoeletrica EttanTMIPGphorTM3 - IEF (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), no qual as proteínas foram fracionadas em função dos seus respectivos pontos isoeletricos (*pIs*). Após IEF, as fitas passaram por etapas de equilíbrio com soluções de DTT e iodoacetamida sob agitação suave por 15 min, respectivamente. O objetivo dessas etapas foi a redução na presença de DTT para atuar na ruptura das pontes dissulfeto presentes nas proteínas e alquilação na presença de iodoacetamida para evitar a reoxidação dos grupos tiol. Em seguida, as fitas foram transferidas para gel de poliacrilamida a 12,5% (v/v) previamente preparados entre placas de vidro (180 x 160 x 1,5 mm), juntamente com um padrão de peso molecular variando de 14,4 a 97 kDa com proteínas de diferentes massas moleculares (β -fosforilase: 97,0 kDa), albumina: 66,0 kDa, ovoalbumina: 45,0 kDa, anidrase carbônica: 30,0 kDa, inibidor de tripsina: 20,1 kDa e α -lactalbumina: 14,4 kDa) para separação em função das suas respectivas massas moleculares, segunda dimensão do processo 2D-PAGE, de acordo com as condições experimentais descritas por Braga et al. (2017) e Lima et al. (2019). Para a programação da corrida eletroforética foi aplicado 100 volts por 30 minutos e mais 250 volts por 2 horas. Após a eletroforese, os géis foram imersos em solução fixadora e em seguida as proteínas foram coradas e reveladas com Coomassie G-250 coloidal (USB, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) após 72 horas.

Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 33 dias de idade) e final (34 a 42 dias de idade).

INGREDIENTES	Pré-Inicial					Inicial				
	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
Milho	54,52	54,55	54,58	54,60	54,63	56,26	56,30	56,32	56,34	56,37
Farelo de soja, 46%	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	34,00	34,00	34,00	34,00	34,00
Óleo soja	1,057	0,725	0,503	0,282	0,060	1,899	1,567	1,346	1,124	0,903
Farinha de vísceras	4,766	4,761	4,757	4,754	4,751	4,487	4,482	4,479	4,476	4,472
Fosfato bicálcico	1,263	1,263	1,264	1,264	1,265	1,080	1,081	1,081	1,082	1,082
Calcário	0,843	0,843	0,843	0,844	0,844	0,765	0,765	0,765	0,765	0,765
Bicarbonato de Sódio	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035
OSM ¹	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,367	0,367	0,367	0,367	0,366	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
L-Lisina HCL 99%	0,227	0,227	0,227	0,227	0,227	0,233	0,233	0,233	0,233	0,233
L-Treonina 98,5%	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092
Anticoccidiano ²	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095
Premix Vit. ³	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. ⁴	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição nutricional calculada										
EM (kcal/kg)	2975	2975	2975	2975	2975	3050	3050	3050	3050	3050
Proteína Bruta (%)	24,27	24,27	24,27	24,27	24,27	23,31	23,31	23,31	23,31	23,31
Cálcio (%)	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,878	0,878	0,878	0,878	0,878
Fósforo disp. (%)	0,463	0,463	0,463	0,463	0,463	0,419	0,419	0,419	0,419	0,419
Potássio (%)	0,597	0,597	0,597	0,597	0,597	0,598	0,598	0,598	0,598	0,598
Sódio (%)	0,225	0,225	0,225	0,225	0,225	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218
Cloro (%)	0,202	0,202	0,202	0,202	0,202	0,194	0,194	0,194	0,194	0,194
Lisina dig. (%)	1,441	1,441	1,441	1,441	1,441	1,384	1,384	1,384	1,384	1,384
Metionina (%)	0,591	0,591	0,591	0,591	0,591	0,567	0,567	0,567	0,567	0,567
Met+Cys dig. (%)	1,066	1,066	1,066	1,066	1,066	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024
Triptofano (%)	0,259	0,259	0,259	0,259	0,259	0,249	0,249	0,249	0,249	0,249
Treonina (%)	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,955	0,955	0,955	0,955	0,955

INGREDIENTES	Crescimento					Final				
	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
Milho	61,43	61,47	61,50	61,52	61,54	66,89	66,93	66,96	66,99	67,01
Farelo de soja, 46%	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	25,80	25,79	25,78	25,78	25,78
Óleo soja	2,973	2,640	2,419	2,198	1,976	2,916	2,583	2,360	2,138	1,916
Farinha de vísceras	2,273	2,268	2,265	2,261	2,258	1,462	1,461	1,461	1,460	1,460
Fosfato bicálcico	1,170	1,170	1,171	1,171	1,171	0,890	0,890	0,890	0,890	0,890
Calcário	0,678	0,678	0,678	0,678	0,678	0,660	0,660	0,661	0,661	0,661
Bicarbonato de Sódio	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
OSM ¹	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,314	0,314	0,314	0,314	0,314	0,275	0,275	0,275	0,275	0,275
L-Lisina HCL 99%	0,257	0,257	0,257	0,257	0,257	0,271	0,271	0,271	0,272	0,272
L-Treonina 98,5%	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091	0,082	0,082	0,082	0,082	0,082
Anticoccidiano ²	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	-	-	-	-	-
Premix Vit. ³	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. ⁴	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Composição nutricional calculada

EM (kcal/kg)	3150	3150	3150	3150	3150	3200	3200	3200	3200	3200
Proteína Bruta (%)	20,58	20,58	20,58	20,58	20,58	18,57	18,57	18,57	18,57	18,57
Cálcio (%)	0,758	0,758	0,758	0,758	0,758	0,634	0,634	0,634	0,634	0,634
Fósforo disp. (%)	0,374	0,374	0,374	0,374	0,374	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296
Potássio (%)	0,599	0,599	0,599	0,599	0,599	0,593	0,593	0,593	0,593	0,593
Sódio (%)	0,208	0,208	0,208	0,208	0,208	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197
Cloro (%)	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,172	0,172	0,172	0,172	0,172
Lisina dig. (%)	1,239	1,239	1,239	1,239	1,239	1,118	1,118	1,118	1,118	1,118
Metionina (%)	0,508	0,508	0,508	0,508	0,508	0,458	0,458	0,458	0,458	0,458
Met+Cys dig. (%)	0,917	0,917	0,917	0,917	0,917	0,827	0,827	0,827	0,827	0,827
Triptofano (%)	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201
Treonina (%)	0,855	0,855	0,855	0,855	0,855	0,771	0,771	0,771	0,771	0,771

¹OSM= Óleo da semente de maracujá; ² Salinomicina (66ppm); ³Premix vitamínico (níveis de garantia/kg de ração): Vitamina A (min) 10.000 U.I.; Vitamina D3 (min) 2.500 U.I.; Vitamina E (min) 17,5 U.I.; Vitamina K3 (min) 2 mg; Vitamina B1 (min) 1,5 mg; Vitamina B2 (min) 7,5 mg; Niacina (min) 25 mg; Ácido pantatênico 15 mg; Vitamina B6 (min) 2 mg; Ácido fólico (min) 0,5 mg; Biotina (min) 60 mcg; Vitamina B12 (min) 15 mcg; ⁴Premix Mineral (níveis de garantia/kg de ração): Ferro (min) 30 mg; Cobre (min) 6 mg; Manganês (min) 70 mg; Zinco (min) 50 mg; Iodo (min) 1 mg; Selênio (min) 0,35 mg; Cobalto (min) 0,2 mg.

2.4. Análise de imagem

Após remoção do corante dos géis com água ultrapura, os géis dos grupos experimentais foram escaneados por meio do *software Image Master Platinum* versão 7.0 (GeneBio, Genebra, Suíça) para obtenção de parâmetros como número de *spots*, percentual de correlação (*matching*), ponto isoelétrico e massa molecular, bem como a expressão desses *spots* proteicos considerando os diferentes grupos experimentais. Foram utilizadas três repetições de cada gel por grupo experimental para avaliar a reprodutibilidade de cada *spot* de proteína, no qual o programa de análise de imagens permitiu sobrepor a imagem de um gel sobre o outro (Silva et al., 2013; Lima et al., 2019; Bittarello et al., 2020).

2.5. Caracterização das proteínas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS)

Os *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os grupos experimentais foram extraídos dos géis com auxílio de bisturi, recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) e submetidos às seguintes etapas: remoção do corante, redução e alquilação das proteínas, digestão trípica utilizando solução de tripsina 10 ng mL⁻¹ e eluição dos peptídeos conforme procedimentos descritos por Shevchenko et al. (2006). As sequências peptídicas nos extratos obtidos pelo processo de digestão trípica foram caracterizadas por LC-MS/MS. As alíquotas das soluções de peptídeos eluídos foi analisada utilizando o sistema *nanoAcquity UPLC* acoplado ao espectrômetro de massa *Xevo Q-TOF G2* (Waters, Manchester, UK). A identificação das proteínas foi realizada por meio da busca no banco de dados *UniProt* (www.uniprot.org) e pesquisado pela espécie *Gallus Gallus domesticus*. Foram consideradas para análise proteínas com escores acima de 60. Após identificadas e obtidas as sequências *FASTA* das proteínas, as sequências foram analisadas pelo *software BLAST2GO* baseado nos termos *GO* (*Gene Ontology*) para serem categorizadas de acordo com processos biológicos, componente celular e função molecular (Conesa et al., 2005).

2.6. Análise estatística

A gaiola foi considerada a unidade experimental e foi feito um *pool* baseado na homogeneização de amostras do tecido hepático de 1 ave por gaiola do mesmo tratamento (9 gaiolas/grupo), totalizando 45 frangos (9 frangos x 5 grupos). As imagens dos géis obtidos no fracionamento do proteoma hepático foram analisadas pelo *software*

ImageMaster Platinum versão 7.0 (GE Healthcare). Este *software* realizou a comparação entre os grupos (três géis/grupo) para verificar os *spots* proteicos diferencialmente expressos, comparando volume, distribuição, intensidade relativa, ponto isoelétrico e massa molecular dos *spots* utilizando análise de variância (ANOVA, teste t). Os *spots* com diferença de expressão foram excisados dos géis quando $P < 0,05$ para identificação das proteínas por *LC-MS/MS*.

2.7. Vias metabólicas e interação proteína-proteína

Para avaliar o efeito do OSM sobre as vias metabólicas, foram utilizados os acessos das proteínas diferencialmente expressas na ferramenta análise de enriquecimento da via do banco de dados online *Reactome* (reactome.org). As vias com taxa de descoberta falsa (FDR) $< 0,05$ foram consideradas significativamente enriquecidas. Para obtenção da rede de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas foi utilizado a ferramenta online *String* versão 11.5 sendo considerado na análise o nível de confiança médio (0,400).

3. Resultados

As imagens representativas dos géis de poliacrilamida obtidos por *2D-PAGE* do fígado de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor são demonstradas na figura 1. Foram identificadas 129 proteínas por *LC-MS/MS* (Tabela 3), das quais 55 proteínas foram diferencialmente expressas considerando os resultados de *Score* mais altos, bem como o pI e MM teóricos que mais se aproximaram dos valores experimentais registrados durante a análise de imagem.

Entre as proteínas diferencialmente expressas, 22 foram classificadas de acordo com o objetivo do estudo em quatro grupos conforme suas principais atividades metabólicas: proteínas de choque térmico, proteínas antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e carboidratos (Tabela 4). A análise da ontologia genética classificou as sequências de proteínas em diversos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares que podem ser observados na Figura 2.

Na Tabela 5 estão apresentadas as cinco vias metabólicas (gliconeogênese, metabolismo de carboidratos, metabolismo, glicólise, e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio) significativamente enriquecidas pelo *Reactome*. Estes resultados demonstram que as vias metabólicas afetadas estão diretamente relacionadas com as principais funções desempenhadas pelas proteínas analisadas.

A rede de interação proteína-proteína das proteínas alteradas pela suplementação de OSM foi construída por meio do programa *String* utilizando o genoma *Gallus gallus* (Figura 3), demonstrando quais proteínas contribuem conjuntamente para uma função compartilhada. A rede foi agrupada em três clusters (agrupamento *kmeans*), onde é possível identificar a interação entre as proteínas de choque térmico (cluster azul) envolvidas no reparo de proteínas mal dobradas, proteínas antioxidantes (cluster vermelho) responsáveis pela remoção de radicais livres, e entre as proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e carboidratos (cluster verde).

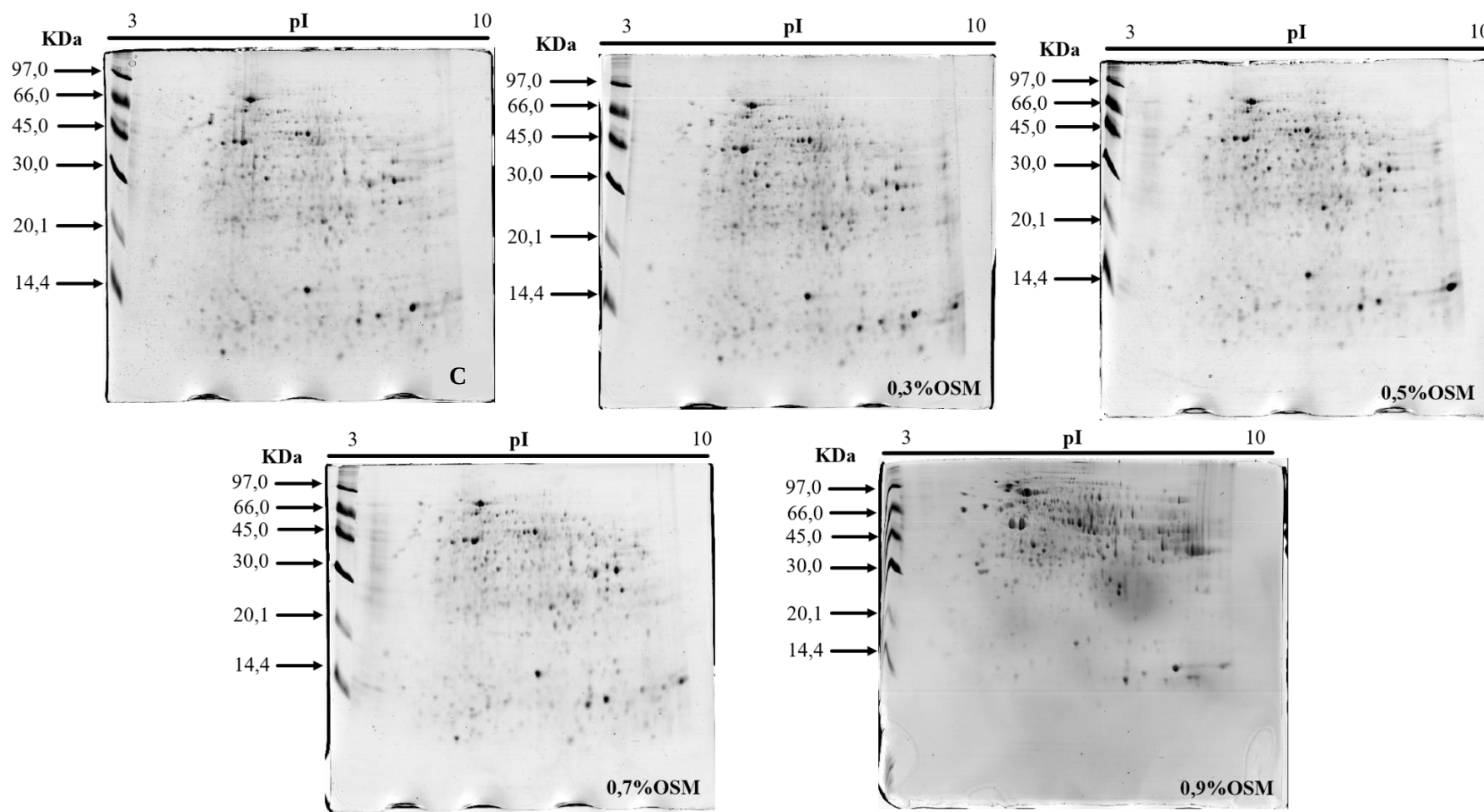


Figura 1. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) do tecido hepático de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor. C: controle, OSM: óleo da semente de maracujá.

Tabela 3. Proteínas identificadas no fígado de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS).

Protein access	Gene symbol	Protein	pI/MW(Da)	Score
P07341	<i>ALDOB</i>	Fructose-bisphosphate aldolase B	8.81/39295.78	1746.25
P00368	<i>GLUD1</i>	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	8.48/55712.06	380.1942
P31335	<i>ATIC</i>	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC	8.40/64414.82	112.1429
P00356	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8.70/35703.97	65.1689
Q8JFP1	<i>EIF4A2</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-II	5.33/46371.31	4602.994
Q5ZMQ2	<i>ACTG1</i>	Actin, cytoplasmic 2	5.31/41792.84	1221.098
P53478	<i>N/A</i>	Actin, cytoplasmic type 5	5.30/41835.87	1221.098
P60706	<i>ACTB</i>	Actin, cytoplasmic 1	5.29/41736.73	1221.098
Q5ZM36	<i>EIF4A3</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-III	6.30/46815.87	500.7937
P51913	<i>ENO1</i>	Alpha-enolase	6.17/47305.01	257.0101
P68139	<i>ACTA1</i>	Actin, alpha skeletal muscle	5.23/42051.03	248.5884
P68034	<i>ACTC1</i>	Actin, alpha cardiac muscle 1	5.23/42018.97	248.5884
P63270	<i>ACTG2</i>	Actin, gamma-enteric smooth muscle	5.31/41876.88	248.5884
P08023	<i>ACTA2</i>	Actin, aortic smooth muscle	5.24/41994.92	248.5884
P07322	<i>ENO3</i>	Beta-enolase	7.28/47196.08	170.7394
O57391	<i>ENO2</i>	Gamma-enolase	4.84/47308.46	87.3216
P19121	<i>ALB</i>	Albumin	5.51/69918.19	65.6484
P02552	<i>N/A</i>	Tubulin alpha-1 chain	4.96/45900.72	5492.072
Q5ZL72	<i>HSPD1</i>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5.72/60972.56	3652.898
P09642	<i>N/A</i>	Tubulin alpha-3 chain	5.19/36087.83	3589.188
P09644	<i>N/A</i>	Tubulin alpha-5 chain	4.94/49948.42	3579.418
P09645	<i>N/A</i>	Tubulin alpha-8 chain	4.82/36160.94	3046.951
P08070	<i>N/A</i>	Tubulin alpha-2 chain	4.86/49798.11	2571.445
P09643	<i>N/A</i>	Tubulin alpha-4 chain	4.76/35935.60	1911.837

P80566	<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	6.10/15703.60	2155.948
P00940	<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase	6.71/26620.45	179.4643
Q5ZM98	<i>HSPA9</i>	Stress-70 protein, mitochondrial	6.09/73192.32	5425.022
O73885	<i>HSPA8</i>	Heat shock cognate 71 kDa protein	5.46/70826.98	430.4864
P08106	<i>N/A</i>	Heat shock 70 kDa protein	5.52/69750.82	332.263
Q90593	<i>HSPA5</i>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	5.12/72018.51	95.1078
P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	6.85/77776.53	3700.308
P21642	<i>PCK2</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	7.56/71106.29	491.4611
P21872	<i>GART</i>	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	7.51/106544.04	120.8111
Q5ZK03	<i>SEC23A</i>	Protein transport protein Sec23A	6.34/86303.91	62.4248
P00508	<i>GOT2</i>	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	9.39/47241.27	566.9792
Q5ZLN1	<i>PGAM1</i>	Phosphoglycerate mutase 1	7.02/28898.13	244.7894
P12276	<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	5.94/274781.57	292.6981
P01994	<i>HBAA</i>	Hemoglobin subunit alpha-A	8.54/15428.87	135.4075
P23228	<i>HMGCS1</i>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	5.41/57559.06	95.884
P80226	<i>FABP1</i>	Fatty acid-binding protein, liver	8.67/14210.37	465.0665
P16580	<i>GLUL</i>	Glutamine synthetase	6.38/42146.46	87.6059
P08629	<i>TXN</i>	Thioredoxin	5.10/11700.52	504.1598
P20136	<i>GSTM2</i>	Glutathione S-transferase 2	6.84/25892.82	100.2498
P09102	<i>P4HB</i>	Protein disulfide-isomerase	4.69/57409.80	78.7594
P02112	<i>HBB</i>	Hemoglobin subunit beta	8.84/16466.13	2338.827
P02001	<i>HBAD</i>	Hemoglobin subunit alpha-D	7.02/15694.93	473.2623
P02127	<i>N/A</i>	Hemoglobin subunit rho	8.78/16589.21	434.5012
P02128	<i>HBE</i>	Hemoglobin subunit epsilon	9.07/16603.23	434.5012
P02007	<i>N/A</i>	Hemoglobin subunit pi	7.81/15709.04	171.6481
P70081	<i>H4-VIII</i>	Histone H4 type VIII	11.20/11439.41	67.8861

P62801	<i>H4-I</i>	Histone H4	11.36/11367.34	67.8861
P00337	<i>LDHB</i>	L-lactate dehydrogenase B chain	7.07/36318.09	783.1637
P00378	<i>DHFR</i>	Dihydrofolate reductase	7.93/21649.94	148.6893
Q5ZMT0	<i>YWHAE</i>	14-3-3 protein epsilon	4.63/29173.90	313.7717
P0DMQ6	<i>SORD</i>	Sorbitol dehydrogenase	7.09/38144.20	126.1308
P0CB50	<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin-1	8.24/22314.71	121.2862
Q5ZI49	<i>PRPS2</i>	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	6.37/35663.21	1358.28
Q90705	<i>EEF2</i>	Elongation factor 2	6.40/95378.24	204.0252
Q5F3X4	<i>EFTUD2</i>	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	4.85/109477.84	98.9918
Q5ZJF4	<i>PRDX6</i>	Peroxiredoxin-6	5.70/24976.79	1684.907
P07630	<i>CA2</i>	Carbonic anhydrase 2	6.56/29007.75	90.239
P25324	<i>TST</i>	Thiosulfate sulfurtransferase	6.56/32286.51	230.6912
Q5ZKC9	<i>YWHAZ</i>	14-3-3 protein zeta	4.73/27775.13	12351.38
Q5ZLQ6	<i>YWHAB</i>	14-3-3 protein beta/alpha	4.76/27907.15	6195.533
Q5F3W6	<i>YWHAG</i>	14-3-3 protein gamma	4.84/28230.53	5124.856
Q5ZMD1	<i>YWHAQ</i>	14-3-3 protein theta	4.68/27782.28	4262.729
Q9YGG1	<i>EEF1B</i>	Elongation factor 1-beta	4.54/24761.79	1207.509
P51903	<i>PGK</i>	Phosphoglycerate kinase	8.31/44716.87	4811.904
P07850	<i>SUOX</i>	Sulfite oxidase	5.80/50204.65	266.6363
Q91348	<i>N/A</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	6.82/54404.06	215.5867
Q9YH58	<i>FTCD</i>	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	5.87/59153.55	8051.222
Q5ZJK8	<i>CCT7</i>	T-complex protein 1 subunit eta	5.96/60348.58	255.709
P00340	<i>LDHA</i>	L-lactate dehydrogenase A chain	7.75/36514.46	1018.506
O73888	<i>HPGDS</i>	Hematopoietic prostaglandin D synthase	6.74/22730.34	126.345
P23007	<i>CS</i>	Citrate synthase, mitochondrial	8.31/47378.25	70.1806
P20137	<i>N/A</i>	Glutathione S-transferase 5	9.88/3388.92	60.0913

P26697	<i>N/A</i>	Glutathione S-transferase 3	9.06/26325.84	113.3562
Q5ZLF0	<i>ST13</i>	Hsc70-interacting protein	5.07/40158.30	79.786
Q08392	<i>N/A</i>	Glutathione S-transferase	8.86/25298.52	111.4719
Q90835	<i>EEF1A</i>	Elongation factor 1-alpha 1	9.10/50156.86	519.8495
P00504	<i>GOT1</i>	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	8.22/45935.27	332.9474
P38024	<i>AIRC</i>	Multifunctional protein ADE2	8.18/47240.32	83.3754
P08836	<i>FDPS</i>	Farnesyl pyrophosphate synthase	6.16/42153.36	3869.996
P19179	<i>PLS1</i>	Plastin-1	5.47/70939.12	455.8107
Q6EE31	<i>CCT8</i>	T-complex protein 1 subunit theta	5.35/59485.49	143.1289
O93277	<i>WDR1</i>	WD repeat-containing protein 1	6.19/66566.90	968.3096
Q5ZJ08	<i>YARS1</i>	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	6.24/59284.33	332.9967
P51901	<i>ANXA6</i>	Annexin A6	5.41/75218.53	908.1689
P08110	<i>HSP90B1</i>	Endoplasmin	4.83/91555.02	4411.261
Q04619	<i>HSP90AB1</i>	Heat shock cognate protein HSP 90-beta	4.94/83427.45	209.4907
P11501	<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein HSP 90-alpha	5.00/84059.22	92.5225
Q05744	<i>CTSD</i>	Cathepsin D	5.90/43298.06	161.7098
P08250	<i>APOA1</i>	Apolipoprotein A-I	5.59/30680.16	234.8511
Q8UW59	<i>PARK7</i>	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	6.32/19943.16	110.1111
Q5ZI23	<i>HAGH</i>	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	6.42/29031.14	219.1373
Q8JG64	<i>PDIA3</i>	Protein disulfide-isomerase A3	5.76/56181.64	104.3574
O57601	<i>HMX3</i>	Homeobox protein HMX3	8.71/33787.01	79.9531
P81628	<i>ERP29</i>	Endoplasmic reticulum resident protein 29	7.66/25373.25	172.6228
P28337	<i>AMT</i>	Aminomethyltransferase, mitochondrial	9.12/42058.37	181.8587
Q5ZM25	<i>OLA1</i>	Obg-like ATPase 1	8.10/44778.59	82.2543
Q08393	<i>N/A</i>	Glutathione S-transferase	8.76/25413.73	3323.991
Q9IAY5	<i>NUDT16L1</i>	Tudor-interacting repair regulator protein	5.73/33296.38	85.9432
Q5ZKJ4	<i>FGFR1OP2</i>	FGFR1 oncogene partner 2 homolog	5.96/25197.83	107.5338

Q5ZJL5	<i>ADSS2</i>	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	5.93/49454.85	61.3957
Q9I9K9	<i>GATM</i>	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	8.24/48311.33	372.0159
P27463	<i>ALDH1A1</i>	Retinal dehydrogenase 1	7.49/55809.33	322.827
P21265	<i>ADSL</i>	Adenylosuccinate lyase	6.69/54652.97	275.7029
O93344	<i>ALDH1A2</i>	Retinal dehydrogenase 2	5.87/56731.99	145.75
Q5ZK14	<i>DDA1</i>	DET1- and DDB1-associated protein 1	8.73/11884.31	111.6822
Q9I923	<i>RGN</i>	Regucalcin	5.77/33229.57	599.7192
Q5ZME2	<i>MDH1</i>	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6.92/36543.40	157.6787
P00565	<i>CKM</i>	Creatine kinase M-type	6.50/43328.41	123.1646
Q5ZHZ0	<i>DDX39B</i>	Spliceosome RNA helicase DDX39B	5.45/49003.34	151.0137
P23991	<i>ADH1</i>	Alcohol dehydrogenase 1	8.69/39807.50	81.5808
Q5ZMA2	<i>PRPF19</i>	Pre-mRNA-processing factor 19	6.19/55134.63	69.3062
P09244	<i>N/A</i>	Tubulin beta-7 chain	4.78/49670.82	1123.167
P09206	<i>N/A</i>	Tubulin beta-3 chain	4.77/49860.99	1011.942
P09652	<i>N/A</i>	Tubulin beta-4 chain	4.86/50420.67	948.0264
P09203	<i>N/A</i>	Tubulin beta-1 chain	4.78/49909.01	881.7851
P32882	<i>N/A</i>	Tubulin beta-2 chain	4.78/49953.06	881.7851
P09653	<i>N/A</i>	Tubulin beta-5 chain	4.77/49971.25	788.6357
P09207	<i>N/A</i>	Tubulin beta-6 chain	4.96/50153.64	506.2223
O42265	<i>PSMA1</i>	Proteasome subunit alpha type-1	6.08/28925.06	2229.996
O73930	<i>PCBD1</i>	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	6.04/11997.53	800.0145
P05122	<i>CKB</i>	Creatine kinase B-type	5.92/42870.75	231.2479
Q90734	<i>ACTN4</i>	Alpha-actinin-4	5.13/104207.29	2364.672
P05094	<i>ACTN1</i>	Alpha-actinin-1	5.23/103161.53	699.2343
P20111	<i>ACTN2</i>	Alpha-actinin-2	5.26/104275.09	299.6845
Q5ZJ54	<i>CCT6</i>	T-complex protein 1 subunit zeta	6.36/57644.65	204.9525

Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas (teste t, $P < 0,05$) no fígado de frangos de corte suplementados com OSM (0,3; 0,5; 0,7 e 0,9%) sob estresse cíclico por calor em relação ao grupo controle.

Protein	Gene symbol	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
<i>Proteínas de choque térmico</i>					
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	+1.33781	+1.59668		+1.4106
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	+1.11394			+3.20664
Heat shock 70 kDa protein	N/A	+1.50065			+3.20664
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	+1.50065	+1.59668		+1.4106
Heat shock cognate protein HSP 90-beta	HSP90AB1				Presente
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1				Presente
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5	+1.50065			+3.20664
<i>Proteínas Antioxidantes</i>					
Thioredoxin	TXN			-1.41889	-11.342
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1				-4.4163
Peroxiredoxin-1	PRDX1				-1.92674
Peroxiredoxin-6	PRDX6				-2.32162
Glutathione S-transferase 2	GSTM2				-2.32162
Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	PARK7				-1.92674
<i>Metabolismo de lipídeos</i>					
Fatty acid synthase	FASN		+1.51238	-1.19717	+1.31706
Fatty acid-binding protein, liver	FABP1				-3.60731
Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS				Presente
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1				Presente
<i>Metabolismo de carboidratos</i>					
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	PCK2	-1.41802		-1.39114	
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1				-2.61189
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1			-3.72863	
Sorbitol dehydrogenase	SORD				Presente
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	N/A				+1.55462

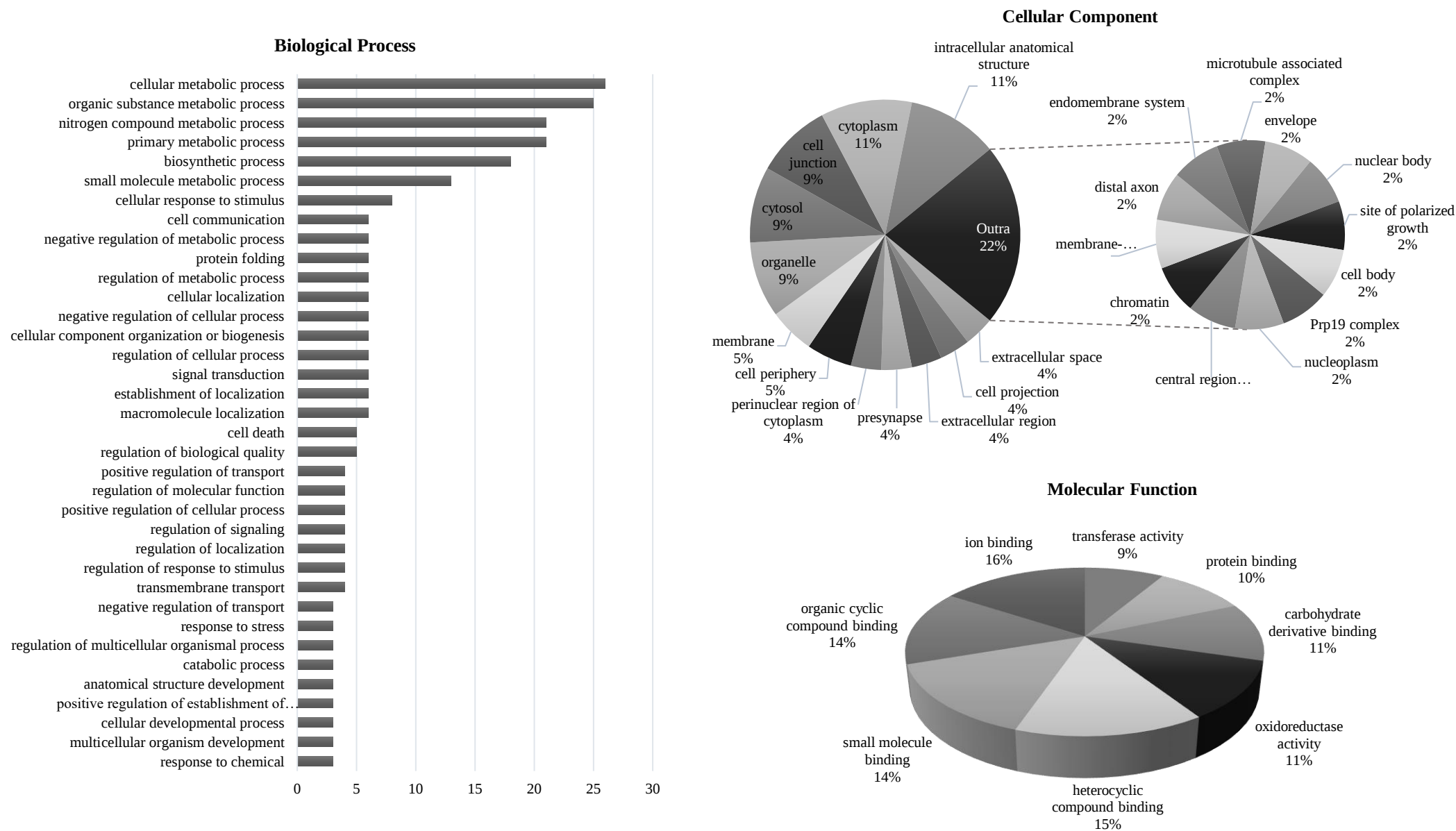


Figura 2. Classificação das proteínas caracterizadas no proteoma hepático de frangos de corte utilizando o *software* Blast2GO.

Tabela 5. Vias metabólicas significativamente enriquecidas utilizando *Reactome*.

Identificação da via	Via metabólica	FDR
R-GGA-352875	Gluconeogenesis	2.07E-05
R-GGA-353098	Carbohydrate metabolism	4.49E-05
R-GGA-1660598	Metabolism	4.97E-04
R-GGA-352882	Glycolysis	0.009
R-GGA-3299685	Detoxification of Reactive Oxygen Species	0.015

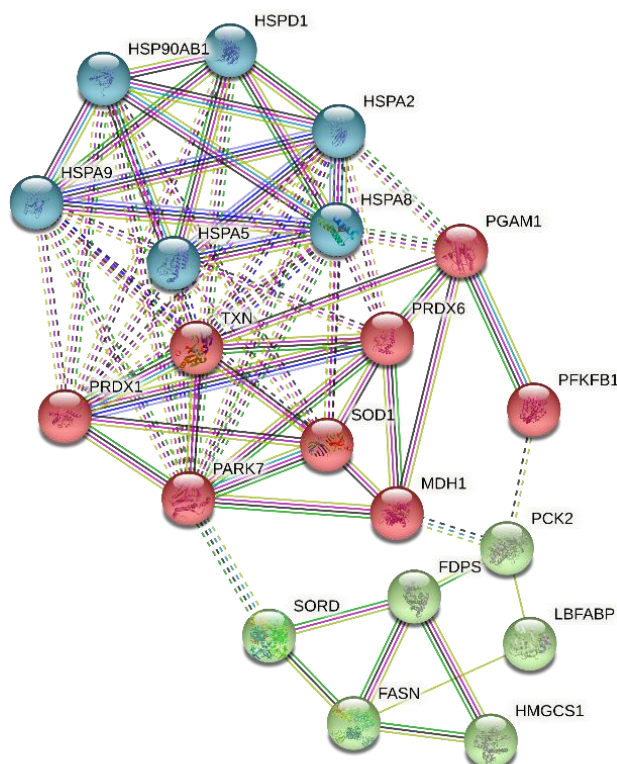


Figura 3. Rede de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas do fígado de frangos de corte suplementados com OSM sob estresse cíclico por calor. Cluster azul: HSPD1 (60 kDa heat shock protein, mitochondrial), HSP90AB1 (Heat shock cognate protein HSP 90-beta), HSPA2 (Heat shock-related 70 kDa protein 2), HSPA9 (Stress-70 protein, mitochondrial), HSPA5 (Endoplasmic reticulum chaperone BiP) e HSPA8 (Heat shock cognate 71 kDa protein). Cluster vermelho: PRDX1 (Peroxiredoxin-1), PRDX6 (Peroxiredoxin-6), TXN (Thioredoxin), PARK7 (Protein/nucleic acid deglycase DJ-1), SOD1 (Superoxide dismutase [Cu-Zn]), PGAM1 (Phosphoglycerate mutase 1), MDH1 (Malate dehydrogenase, cytoplasmic) e PFKFB1 (6-phosphofructokinase 2). Cluster verde: SORD (Sorbitol dehydrogenase), FDPS (Farnesyl pyrophosphate synthase), PCK2 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial), FASN (Fatty acid synthase), LBFABP (Fatty acid-binding protein, liver) e HMGCS1 (Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic).

4. Discussão

4.1. Chaperonas moleculares

No presente estudo a suplementação do OSM sob estresse cíclico por calor aumentou a expressão das proteínas *60 kDa heat shock protein, mitochondrial*, *Stress-70 protein, mitochondrial*, *Heat shock 70 kDa protein*, *Heat shock cognate 71 kDa protein*, *Heat shock cognate protein HSP 90-beta*, *Heat shock cognate protein HSP 90-alpha* e *Endoplasmic reticulum chaperone BiP*. Da mesma forma, em condições de estresse térmico, Yang et al. (2021) observaram maiores níveis de *mRNA de HSP60, 70 e 90* quando as aves foram suplementadas com resveratrol, considerado um antioxidante natural. Tang et al. (2018) também demonstraram que o extrato de alecrim (antioxidante natural) na dieta de frangos de corte induz maior expressão de *HSP70* sob condições de estresse térmico e em condições normais de temperatura. As chaperonas moleculares, denominadas de proteínas de estresse ou proteínas de choque térmico, são consideradas as principais moléculas envolvidas na manutenção do equilíbrio da homeostase celular, auxiliando no dobramento e transporte de proteínas, estabilização do citoesqueleto, regulação da resposta ao estresse e defesa central contra danos às proteínas induzidas por vários estresses (Laskowska et al., 2019). De acordo com sua função e peso molecular, as chaperonas podem ser classificadas em várias famílias, entre elas as mais importantes são as *HSP100*, *HSP90*, *HSP70*, *HSP60*, *HSP40* e as *HSPs* pequenas de baixo peso molecular entre 15 a 30 kDa (He et al., 2019). A *Heat shock cognate protein HSP 90* e suas isoformas são predominantes no meio intracelular e estão envolvidas na maturação de vários receptores e quinases (Zininga et al., 2018). A *60 kDa heat shock protein, mitochondrial* é uma chaperonina que promove o enovelamento de proteínas, evita agregação de proteínas e se liga a moléculas de proteínas dobradas incorretamente sob condições de estresse na matriz mitocondrial (Siddiqui et al., 2020). *Heat shock 70 kDa protein*, *Heat shock cognate 71 kDa protein* e *Stress-70 protein, mitochondrial* são proteínas pertencentes a família *HSP 70* e auxiliam no dobramento de novas proteínas, transporte de proteínas através das membranas, controle da atividade de proteínas regulatórias, reenovelamento de proteínas mal dobradas, evitam agregação e degradam proteínas desnaturadas e convertem proteínas mal dobradas em seu estado nativo (Laskowska et al., 2019). O acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático aumenta a expressão da *Endoplasmic reticulum chaperone BiP*, a qual desempenha papel importante na degradação de proteínas mal dobradas e na redução da

apoptose devido aumentar a capacidade de dobramento das proteínas, regulando desta forma o controle na qualidade no lúmen do retículo endoplasmático (Park et al., 2017a).

Não está claro os mecanismos pelos quais o OSM modula as expressões das *HSPs*. A complexidade desses mecanismos no fígado de frangos é refletida pelas vias metabólicas significativamente enriquecidas (Tabela 05) e pelas diversas interações proteína-proteína (Figura 3), as quais cooperam para uma função específica e compartilhada entre as proteínas *HSPs*, proteínas antioxidantes e proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e de carboidratos. Foi relatado a presença do β -caroteno no OSM (Zanetti et al., 2021), o qual pode ter complementado a ação antioxidante no fígado dos frangos sob estresse por calor. Foote e Denny (1968) relataram que o β -caroteno reduz os radicais livres por meio da capacidade de controlar a formação do oxigênio *singlet*, o qual pode diminuir o nível de oxidação. Nesse sentido, foi observado que várias proteínas foram recrutadas para reestabelecer o estado de homeostase ou sinalizar outros processos biológicos (Tabela 2). Dessa forma, no presente estudo a suplementação de OSM durante estresse por calor induziu a maior expressão das proteínas de choque térmico no fígado, demonstrando mecanismo citoprotetor e permitindo que as células sobrevivam, sendo capaz de atenuar os efeitos deletérios que o estresse térmico pode ocasionar nos frangos de corte.

4.2. Proteínas antioxidantes

A suplementação do OSM em condições de estresse cíclico por calor, nesta pesquisa, diminuiu a expressão das proteínas *Thioredoxin*, *Superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *Peroxiredoxin-1*, *Peroxiredoxin-6*, *Glutathione S-transferase 2* e *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1*. Sob condições de estresse a produção de *Superoxide dismutase [Cu-Zn]* é um mecanismo adaptativo com objetivo de diminuir a formação de EROS e manter a homeostase celular (Azadmanesh e Borgstahl, 2018). No entanto, segundo Surai et al. (2019), quando o estresse for muito severo, a atividade da SOD normalmente diminui após ativação por apoptose. Induzidas pela inflamação, *Thioredoxin*, exerce efeito citoprotetor contra vários estresses oxidativos em uma variedade de sistemas (Lee et al., 2013), enquanto a *Peroxiredoxin* pertence à família de peroxidases que reduzem os peróxidos de hidrogênio e atuam como antioxidantes celulares (Rhee e Woo, 2011).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) em excesso são prejudiciais a muitas macromoléculas biológicas importantes, desta forma a rede de sistema antioxidante é a responsável pela prevenção e diminuição dos danos ocasionados nas células. No entanto,

quando a produção de EROS ultrapassa a capacidade do sistema de defesa antioxidante de neutralizá-los, ocorre estresse oxidativo, causando desta forma danos a lipídeos, proteínas e DNA e, conseqüentemente, prejuízos em termos de saúde, crescimento e desenvolvimento nas aves de interesse zootécnico (Surai et al., 2019).

A célula possui três níveis de defesa antioxidante. Quando há uma grande variedade de formação de radicais livres em sistemas biológicos, tanto o primeiro (composto por superóxido dismutase – SOD, glutathione peroxidase – GPx e catalase) quanto o segundo nível (composto por vitamina E, ácido ascórbico e glutathione – GSH) de defesa antioxidante não são suficientes para evitarem danos às moléculas e, portanto, o terceiro nível (composto por sulfóxido de metionina redutase e proteínas de choque térmico – HSPs) lidam com o reparo de moléculas danificadas (Surai et al., 2019).

A presente pesquisa indica que a expressão diferencial hepática de proteínas antioxidantes, incluindo *Thioredoxin*, *Superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *Peroxiredoxin-1*, *Peroxiredoxin-6*, *Glutathione S-transferase 2* e *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1*, foi significativamente diminuída em frangos alimentados com OSM. Este resultado sugere que o OSM em condições de estresse cíclico por calor, não ativou o primeiro e segundo nível de defesa do sistema antioxidante, mas melhorou o status antioxidante ativando o terceiro nível de defesa antioxidante pela maior expressão das chaperonas moleculares. Além disso, o OSM pode ter auxiliado diretamente na remoção das EROS em virtude das propriedades antioxidantes do β -caroteno, α - e β -tocoferol, e polifenóis presentes (Kawakami et al., 2022; Zanetti et al., 2021), resultando na menor expressão das proteínas antioxidantes.

4.3. Metabolismo de lipídeos

O fígado desempenha papel importante no metabolismo lipídico, envolvendo etapas como a captação, síntese, armazenamento, secreção e catabolismo de ácidos graxos e triglicerídeos (Jensen-Urstad e Semenkovich, 2012). Relacionado com o metabolismo lipídico, a suplementação do OSM influenciou quatro proteínas diferencialmente expressas, sendo elas a *Fatty acid synthase*, *Fatty acid-binding protein, liver*, *Farnesyl pyrophosphate synthase* e *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic*.

A *Fatty acid synthase* é geralmente considerada uma proteína de manutenção, sintetizando ácidos graxos para armazenamento de energia, montagem e reparo de membranas e secreção na forma de triglicerídeos de lipoproteínas (Jensen-Urstad e Semenkovich, 2012). Tang. et al. (2015) verificaram que o metabolismo lipídico no

fígado de frangos de corte foi afetado quando submetidos ao estresse calórico, sendo observado menor expressão da proteína *Fatty acid synthase*. De acordo com os autores, a *Fatty acid synthase* provavelmente foi diminuída para economizar energia de modo a manter as necessidades básicas de sobrevivência da célula. Neste sentido, a maior expressão da *Fatty acid synthase* observada no grupo suplementado com OSM, sugere que a demanda energética dos frangos de corte foi menor possivelmente devido ao OSM ter diminuído os efeitos prejudiciais do estresse cíclico por calor, permitindo desse modo a atividade normal da *Fatty acid synthase*.

A síntese da maioria dos lipídeos possui como origem a via do mevalonato e no início dessa via encontra-se a *Farnesyl pyrophosphate synthase* a qual serve como substrato inicial para vários processos biossintéticos (Park et al., 2017b). A *Farnesyl pyrophosphate synthase* é uma proteína chave na via biossintética de isoprenóides, fornecendo precursores para a biossíntese de esteróides, terpenos, colesterol, dolicol e ubiquinonas (Dhar et al., 2013). De forma semelhante e desempenhando função importante na via isoprenóide, a *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic* catalisa a condensação de acetil-CoA com acetoacetil-CoA para formar HMG-CoA redutase em mevalonato, que é um precursor para a síntese de colesterol e outros precursores da via da biossíntese de isoprenóides (Hegardt, 1999). Por razões fisiológicas desconhecidas, a presença dessas proteínas no tecido hepático de frangos suplementados com 0,9% de OSM, demonstrou que o OSM contribuiu positivamente na biossíntese de isoprenóides em condições de estresse cíclico por calor. Os isoprenóides desempenham papéis fundamentais em diversas funções celulares, estando envolvidos na regulação do crescimento, na estrutura da membrana, transporte de elétrons, síntese de glicoproteínas, entre outros (Goldstein e Brown, 1990).

4.4. Metabolismo de carboidratos

No presente estudo, as proteínas *Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]*, *Phosphoglycerate mutase 1* e *Malate dehydrogenase* foram reguladas negativamente nos grupos suplementados com OSM. A proteína *Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]* desempenha função importante na gliconeogênese (catalisando a primeira etapa do ciclo), processo pelo qual a glicose é produzida a partir de fontes não-carboidratos, como aminoácidos, propionato e glicerol (Guo et al., 2013). Ma et al. (2021), relataram em seu estudo que a gliconeogênese hepática foi acelerada em frangos de corte sob estresse térmico, para fornecimento de energia pelo aumento de expressão de mRNA da

forma citosólica e mitocondrial da *Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]*. O proteoma hepático de frangos de corte com ascite também foi alterado, com maior expressão da *Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial*, indicando que a gliconeogênese foi aumentada como forma de regular e reduzir a suscetibilidade à ascite (Wang et al., 2012). A *Phosphoglycerate mutase 1* é uma proteína associada a via glicolítica que convertendo 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato e sua expressão é alterada em frangos acometidos pelas miopatias peitorais que são consideradas doenças metabólicas (Cai et al., 2018; Zhang et al., 2020). Da mesma forma, a *Phosphoglycerate mutase 1* foi mais expressa em frangos com síndrome da morte súbita afetando o metabolismo energético cardíaco (Ning et al., 2019). *Malate dehydrogenase* desempenha função importante no transporte malato/aspartato através da membrana mitocondrial e no ciclo de Krebs dentro da matriz mitocondrial (Minárik et al., 2002). Sua expressão no soro indica dano tecidual e está envolvida com lesões hepáticas em frangos de corte (Gilbert et al., 2011). Estes resultados sugerem que essas proteínas são mais expressas para regular a homeostasia e fornecer energia em condições fisiológicas anormais, e que a menor expressão observada no grupo OSM, demonstrou que a suplementação do OSM reduziu os impactos negativos do estresse cíclico por calor e consequentemente diminuiu o requerimento extra de energia para combater o estresse oxidativo.

A menor expressão da *Sorbitol dehydrogenase* gera acúmulo de sorbitol, causando estresse oxidativo principalmente devido à redução de antioxidantes não enzimáticos (glutathione, ácido ascórbico e taurina) (Obrosova, 2005). Kang e Shim (2020) observaram menor expressão da *Sorbitol dehydrogenase* no fígado de frangos de corte submetido ao estresse térmico, mas verificaram que a expressão da *Sorbitol dehydrogenase* foi recuperada quando os frangos foram submetidos a exposição precoce ao calor aos 5 dias de idade. No presente estudo, a *Sorbitol dehydrogenase* estava presente no fígado dos frangos suplementados com 0,9% de OSM, indicando que a adição do OSM desempenhou papel protetor contra o estresse térmico no tecido hepático.

5. Conclusão

A caracterização do proteoma hepático de frangos de corte suplementados com OSM demonstrou a ativação de vários mecanismos metabólicos para regular a homeostase e auxiliar na resistência ao calor sob condições de estresse cíclico por calor. Os resultados sugerem que o OSM ativou o último nível de defesa pelo aumento da expressão das proteínas de choque térmico promovendo efeito protetor dos efeitos

prejudiciais do estresse térmico. A regulação das proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e carboidratos foram melhoradas por meio da via biossintética de isoprenóides e diminuição da gliconeogênese e glicólise, respectivamente.

6. Referências

- Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Arif, M., Taha, A. E., & Noreldin, A. E. (2019). Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *Journal of Thermal Biology*, 79(September 2018), 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.013>
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J. E., & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866–1874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Azadmanesh, J., & Borgstahl, G. E. O. (2018). A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants*, 7(25), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox7020025>
- Baldassini, W. A., Bonilha, S. F. M., Branco, R. H., Vieira, J. C. S., Padilha, P. M., & Lanna, D. P. D. (2018). Proteomic investigation of liver from beef cattle (*Bos indicus*) divergently ranked on residual feed intake. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2765–2773. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4341-2>
- Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Bataglioli, I. da C., Oliveira, G., Rocha, L. C., Zara, L. F., Buzalaf, M. A. R., Oliveira, L. C. S., Adamec, J., & Padilha, P. de M. (2020). Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. *Science of the Total Environment*, 711, 134547. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134547>
- Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Grove, R. A., Boone, C. H. T., Leite, A. de L., Buzalaf, M. A. R., Fernandes, A. A. H., Adamec, J., & Padilha, P. de M. (2017). A proteomic

- approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 817–832. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.073>
- Cai, K., Shao, W., Chen, X., Campbell, Y. L., Nair, M. N., Suman, S. P., Beach, C. M., Guyton, M. C., & Schilling, M. W. (2018). Meat quality traits and proteome profile of woody broiler breast (pectoralis major) meat. *Poultry Science*, 97, 337–346. <https://doi.org/10.3382/ps/pex284>
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Dembitsky, V. M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44, 1671–1701. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.003>
- Dhar, M. K., Koul, A., & Kaul, S. (2013). Farnesyl pyrophosphate synthase: A key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *New Biotechnology*, 30(2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.07.001>
- Ferrari, R. A., Colussi, F., & Ayub, R. A. (2004). Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(1), 101–102. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452004000100027>
- Foote, C. S., & Denny, R. W. (1968). Chemistry of Singlet Oxygen. VII. Quenching by β -Carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 90(22), 6233–6235.
- Gilbert, E. R., Cox, C. M., Williams, P. M., McElroy, A. P., Dalloul, R. A., Keith Ray, W., Barri, A., Emmerson, D. A., Wong, E. A., & Webb, K. E. (2011). Eimeria species and genetic background influence the serum protein profile of broilers with coccidiosis. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014636>
- Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343, 425–430. <https://doi.org/10.1038/343425a0>

- Guo, F., Zhang, Y., Su, L., Ahmed, A. A., Ni, Y., & Zhao, R. (2013). Breed-dependent transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase, cytosolic form, expression in the liver of broiler chickens. *Poultry Science*, 92(10), 2737–2744. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03189>
- He, J., Xia, C., He, Y., Pan, D., Cao, J., Sun, Y., & Zeng, X. (2019). Proteomic responses to oxidative damage in meat from ducks exposed to heat stress. *Food Chemistry*, 295(May), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.073>
- Hegardt, F. G. (1999). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochemical Journal*, 338(3), 569–582. <https://doi.org/10.1042/bj3380569>
- Itzhaki, R. F., & Gill, D. M. (1964). A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry*, 9(4), 401–410. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90200-3)
- Jastrebski, S. F., Lamont, S. J., & Schmidt, C. J. (2017). Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis. *PLoS ONE*, 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181900>
- Jensen-Urstad, A. P. L., & Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.09.017>
- Kang, D. R., & Shim, K. S. (2020). Proteomic analysis of the protective effect of early heat exposure against chronic heat stress in broilers. *Animals*, 10(12), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ani10122365>
- Kawakami, S., Morinaga, M., Tsukamoto-Sen, S., Mori, S., Matsui, Y., & Kawama, T. (2022). Constituent characteristics and functional properties of passion fruit seed extract. *Life*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/life12010038>
- Lara, L. J., & Rostagno, M. H. (2013). Impact of heat stress on poultry production. *Animals*, 3(2), 356–369. <https://doi.org/10.3390/ani3020356>

- Laskowska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Lipińska, B. (2019). Proteomic analysis of protein homeostasis and aggregation. *Journal of Proteomics*, 198(September), 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.003>
- Lee, S., Kim, S. M., & Lee, R. T. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(10), 1165–1207. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4322>
- Lima, P. M., Vieira, J. C. S., Cavecci-Mendonça, B., Fleuri, L. F., de Lima Leite, A., Buzalaf, M. A. R., Pezzato, L. E., Braga, C. P., & de Magalhães Padilha, P. (2019). Identification of Zinc Absorption Biomarkers in Muscle Tissue of Nile Tilapia Fed with Organic and Inorganic Sources of Zinc Using Metallomics Analysis. *Biological Trace Element Research*, 190, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01765-9>
- Ma, B., Zhang, L., Li, J., Xing, T., Jiang, Y., & Gao, F. (2021). Heat stress alters muscle protein and amino acid metabolism and accelerates liver gluconeogenesis for energy supply in broilers. *Poultry Science*, 100(1), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.090>
- Minárik, P., Tomaášková, N., Kollárová, M., & Antalík, M. (2002). Malate Dehydrogenases - Structure and function. *General Physiology and Biophysics*, 21(3), 257–265.
- Ning, H., Cui, Y., Song, X., Chen, L., Yin, Z., Hua, L., Ren, F., Suo, Y., Wang, X., Zhang, H., Hu, D., & Ge, Y. (2019). iTRAQ-based proteomic analysis reveals key proteins affecting cardiac function in broilers that died of sudden death syndrome. *Poultry Science*, 98(12), 6472–6482. <https://doi.org/10.3382/ps/pez532>
- Obrosova, I. G. (2005). Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(11–12), 1543–1552. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1543>
- Oliveira, L. F. de, Nascimento, M. R. F., Borges, S. V., Ribeiro, P. C. do N., & Ruback, V. R. (2002). Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22(3), 259–262. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000300011>

- Park, J., Zielinski, M., Magder, A., Tsantrizos, Y. S., & Berghuis, A. M. (2017)a. Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. *Nature Communications*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14132>
- Park, K. W., Eun Kim, G., Morales, R., Moda, F., Moreno-Gonzalez, I., Concha-Marambio, L., Lee, A. S., Hetz, C., & Soto, C. (2017)b. The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP Modulates Prion Propagation in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 7(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep44723>
- Qiu, W., Su, W., Cai, Z., Dong, L., Li, C., Xin, M., Fang, W., Liu, Y., Wang, X., Huang, Z., Ren, H., & Wu, Z. (2020). Combined Analysis of Transcriptome and Metabolome Reveals the Potential Mechanism of Coloration and Fruit Quality in Yellow and Purple *Passiflora edulis* Sims. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 12096–12106. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03619>
- Rhee, S. G., & Woo, H. A. (2011). Multiple functions of peroxiredoxins: Peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(3), 781–794. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3393>
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M. I., Donzele, J. L., Sakomura, N. S., Perazzo, F. G., Saraiva, A., Teixeira, M. L., Rodrigues, P. B., Oliveira, R. F., Barreto, S. L. T., & Brito, C. O. (2017). **Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos** (H. S. Rostagno (ed.); 4th ed.). Departamento de Zootecnia, UFV.
- Saeed, M., Abbas, G., Alagawany, M., Kamboh, A. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., & Chao, S. (2019). Heat stress management in poultry farms: A comprehensive overview. *Journal of Thermal Biology*, 84(July), 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.025>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Siddiqui, S. H., Kang, D., Park, J., Choi, H. W., & Shim, K. (2020). Acute heat stress induces the differential expression of heat shock proteins in different sections of the small intestine of chickens based on exposure duration. *Animals*, 10(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10071234>

- Silva, A. C. da, & Jorge, N. (2016). Bioactive compounds of oils extracted from fruits seeds obtained from agroindustrial waste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4), 1–5. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600024>
- Silva, J. K. da, Cazarin, C. B. B., Bogusz Junior, S., Augusto, F., & Maróstica Junior, M. R. (2014). Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel increases colonic production of short-chain fatty acids in Wistar rats. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P2), 1252–1257. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.030>
- Silva, F. A., Cavecci, B., Baldassini, W. A., Lima, P. M., Moraes, P. M., Roldan, P. S., Padilha, Cilene, C. F., & Padilha, P. M. (2013). Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 7(4), 158–165. <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9151-6>
- Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., & Kidd, M. T. (2019). Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants*, 8(7), 1–36. <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>
- Tang, S., Yin, B., Xu, J., & Bao, E. (2018). Rosemary reduces heat stress by inducing CRYAB and HSP70 expression in broiler chickens. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7014126>
- Tang, X., Meng, Q., Gao, J., Zhang, S., Zhang, H., & Zhang, M. (2015). Label-free Quantitative Analysis of Changes in Broiler Liver Proteins under Heat Stress using SWATH-MS Technology. *Scientific Reports*, 5(September), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep15119>
- Wang, Y., Guo, Y., Ning, D., Peng, Y., Cai, H., Tan, J., Yang, Y., & Liu, D. (2012). Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-41>
- Wang, Y., Jia, X., Hsieh, J. C. F., Monson, M. S., Zhang, J., Shu, D., Nie, Q., Persia, M. E., Rothschild, M. F., & Lamont, S. J. (2021). Transcriptome response of liver and muscle in heat-stressed laying hens. *Genes*, 12(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes12020255>

- Yang, C., Luo, P., Chen, S. jian, Deng, Z. chao, Fu, X. liang, Xu, D. ning, Tian, Y. bo, Huang, Y. mao, & Liu, W. jun. (2021). Resveratrol sustains intestinal barrier integrity, improves antioxidant capacity, and alleviates inflammation in the jejunum of ducks exposed to acute heat stress. *Poultry Science*, 100(11), 101459. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101459>
- Zanetti, L. H., Granero, L., Da Luz, P. A., Poletto, M., Lala, B., Delbem, N. L. C., Sobral, N. C., Brito, E. P., Denadai, J. C., Andrighetto, C., Roça, R. de O., & Sartori, J. R. (2021). Chemical, Physical And Oxidative Characteristics Of Broilers Meat Supplemented With Passion Fruit Seed Oil. *International Journal for Innovation Education and Research*, 9(12), 69–83. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol9.iss12.3555>
- Zanetti, L. H., Murakami, A. E., Diaz-Vargas, M., Guerra, A. F., Ospina-Rojas, I. C., Nascimento, G. R., Santos, T. C. dos, & Pintro, P. T. M. (2016). By-product of passion fruit seed (*Passiflora edulis*) in the diet of commercial laying hens. *Canadian Journal of Animal Science*, 494, 488–494. <https://doi.org/10.1139/cjas-2016-0210>
- Zanetti, L. H., Murakami, A. E., Diaz-Vargas, M., Guerra, A. F., Ospina-Rojas, I. C., Nascimento, G. R., Santos, T. C. dos, & Pintro, P. T. M. (2017). By-Product Of Passion Fruit Seed (*Passiflora Edulis*) In The Diet of Broilers. *Canadian Journal of Animal Science*, 98, 109–118. <https://doi.org/10.1139/cjas-2016-0210>
- Zeferino, C. P., Komiyama, C. M., Pelícia, V. C., Fascina, V. B., Aoyagi, M. M., Coutinho, L. L., Sartori, J. R., & Moura, A. S. A. M. T. (2016). Carcass and meat quality traits of chickens fed diets concurrently supplemented with vitamins C and E under constant heat stress. *Animal*, 10(1), 163–171. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001998>
- Zeng, T., Jiang, X., Li, J., Wang, D., Li, G., Lu, L., & Wang, G. (2013). Comparative Proteomic Analysis of the Hepatic Response to Heat Stress in Muscovy and Pekin Ducks: Insight into Thermal Tolerance Related to Energy Metabolism. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076917>
- Zhang, Q., Yang, Y. Z., Lu, Y. Q., & Cao, Z. W. (2021). iTRAQ-based quantitative proteomic analyses the cycle chronic heat stress affecting liver proteome in

- yellow-feather chickens. *Poultry Science*, 100(6), 101111. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101111>
- Zhang, X., Zhai, W., Li, S., Suman, S. P., Chen, J., Zhu, H., Antonelo, D. S., & Schilling, M. W. (2020). Early postmortem proteome changes in normal and woody broiler breast muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 11000–11010. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03200>
- Zheng, A., Chang, W., Liu, G., Yue, Y., Li, J., Zhang, S., Cai, H., Yang, A., & Chen, Z. (2016). Molecular differences in hepatic metabolism between AA broiler and big bone chickens: A proteomic study. *PLoS ONE*, 11(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164702>
- Zheng, H. T., Zhuang, Z. X., Chen, C. J., Liao, H. Y., Chen, H. L., Hsueh, H. C., Chen, C. F., Chen, S. E., & Huang, S. Y. (2021). Effects of acute heat stress on protein expression and histone modification in the adrenal gland of male layer-type country chickens. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85868-1>
- Zininga, T., Ramatsui, L., & Shonhai, A. (2018). Heat shock proteins as immunomodulants. *Molecules*, 23(11), 2–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23112846>

CAPÍTULO 3

Proteômica *shotgun* revela alterações no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com óleo da semente de maracujá sob condições de estresse cíclico por calor

Artigo redigido de acordo com as normas adaptadas do periódico “*Food Chemistry*”
(*JCR* 2021: 9.231)

Proteômica shotgun revela alterações no músculo Pectoralis major de frangos de corte suplementados com óleo da semente de maracujá sob condições de estresse cíclico por calor

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as proteínas diferencialmente expressas no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte, suplementados com óleo da semente de maracujá (OSM) em condições de estresse cíclico por calor. Foram alojados 90 pintainhos machos de um dia de idade em gaiolas dispostas em câmara climática, onde foram mantidos sob estresse cíclico por calor durante oito horas por dia do início ao final do experimento. As aves foram distribuídas em dois grupos experimentais, sendo um grupo suplementado com 0,9% de OSM e um grupo controle (CON) sem a suplementação de OSM. Aos 36 dias de idade, 18 aves foram abatidas para coleta das amostras de músculo. A partir de *pools* das amostras de filé de peito (músculo *Pectoralis major*) de cada grupo, foi realizado a clivagem proteolítica dos extratos proteicos e posteriormente os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). A suplementação de 0,9% de OSM revelou a modulação de 57 proteínas no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. Dentre elas, quatro proteínas foram reguladas positivamente e 46 proteínas foram reguladas negativamente. Além disso, sete proteínas foram expressas unicamente no grupo CON. Estes resultados sugerem que a suplementação de OSM demonstrou mecanismo adaptativo para aumentar a tolerância ao calor, reduzindo o estresse oxidativo. Além disso, ativando mecanismos de neuroproteção, proteção celular contra ocorrência de apoptose celular, diminuição das respostas inflamatórias e regulação do metabolismo energético.

Palavras-chave: estresse oxidativo, *gel free*, LC-MS/MS

1. Introdução

A carne de frango representa uma fonte alimentar proteica para consumo humano muito apreciada globalmente. No entanto, sua qualidade é influenciada por fatores como ambiente, estrutura muscular, interação de constituintes químicos, estresse, entre outros (Joo, Kim, Hwang, & Ryu, 2013). Pesquisas recentes demonstraram que a aplicação de abordagens proteômicas na busca de biomarcadores de proteínas para avaliar a qualidade da carne é uma análise nova e estratégica para garantir carne de alta qualidade (Cao, Xiao, Ge, & Wu, 2020; J. Zhang et al., 2021). Compreender as vias biológicas e os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da qualidade da carne de frango, principalmente em condições estressantes, é uma tendência global e de importância fundamental para a indústria da carne, pois pode fornecer marcadores fenotípicos capazes de prever sua qualidade (Huang et al., 2020).

O estresse por calor representa impactos negativos significativos na produção avícola, dificultando que as aves atinjam seu potencial produtivo. A alta eficiência do frango moderno, consequência da seleção genética, trouxe menor tolerância as altas temperaturas ambientais devido a redução da capacidade termorreguladora (Zheng et al., 2021). Nesse sentido, sob condições de estresse térmico, as aves mudam suas respostas comportamentais e homeostase fisiológica, desencadeando inúmeras alterações genômicas, bioquímicas, fisiológicas e imunológicas para manter a temperatura corporal normal, e consequentemente, interferindo no desempenho produtivo e na qualidade da carne das aves (Abdelnour et al., 2019; Jiang, Mohammed, Jacobs, Cramer, & Cheng, 2020; Lara & Rostagno, 2013; Zhuang, Chen, Chen, Lin, & Huang, 2019).

A utilização de alimentos naturais que possuem substâncias antioxidantes torna-se interessante para amenizar os efeitos prejudiciais que o estresse térmico acarreta no desempenho das aves (Tang, Yin, Xu, & Bao, 2018; Yang et al., 2021). Uma alternativa promissora é a utilização dos resíduos da semente de maracujá, o qual possui elevado teor de óleo em sua composição, contendo tocoferóis, carotenóides, fenólicos e fitoesteróis (Ayala-Zavala et al., 2011; Dembitsky et al., 2011; Kawakami et al., 2022). Esses compostos bioativos presente no óleo da semente de maracujá (OSM) indicam capacidade para atuarem como antioxidante natural, pois podem minimizar os efeitos do estresse oxidativo e ajudar na tolerância em condições estressantes nas aves domésticas (Silva & Jorge, 2016; Zanetti et al., 2021). Além disso, podem demonstrar o potencial do OSM como um alimento funcional em dietas de frangos de corte (Qiu et al., 2020; Zanetti et

al., 2017). Desta forma, a proteômica *Gel free* ou *shotgun* pode ser utilizada para melhor caracterização em nível molecular e fornecer insights em relação as adaptações fisiológicas perante estresse térmico nas aves (Gilmore & Washburn, 2010; Guglielmetti et al., 2018). Algumas evidências demonstraram que análises proteômicas do tecido muscular quando submetidas a altas temperaturas ambientais ocasionam danos oxidativos e redução da qualidade da carne em aves, mas que proteínas específicas podem atuar nos mecanismos de defesa celular e contribuir na identificação de biomarcadores do estresse e qualidade da carne (He et al., 2019; Xing et al., 2017). Nesse sentido, o fracionamento do proteoma muscular das aves permite avaliar quais proteínas desempenham papel relevante nos mecanismos moleculares e contribui para o desenvolvimento do músculo do peito e qualidade da carne durante o estresse térmico (Mouzo et al., 2020; J. Zhang et al., 2021).

Até o momento, não há relatos na literatura científica sobre a utilização da proteômica *shotgun* para verificar os efeitos da suplementação do óleo da semente de maracujá (OSM) nas mudanças de expressão de proteínas no tecido muscular de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. Portanto, o objetivo deste estudo é caracterizar as proteínas diferencialmente expressas no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte suplementados com OSM em condições de estresse cíclico por calor.

2. Material e métodos

Os procedimentos experimentais realizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – SP, sob o protocolo 0106/2019.

2.1. Animais e grupos experimentais

Foram alojados 90 pintainhos machos da linhagem Cobb 500 com 1 dia de idade em câmara climática dotada de gaiolas de arame galvanizado (0,4 x 0,5 x 0,6 m) com comedouros tipo calha e bebedouros tipo nipple, sendo considerado 5 aves por gaiola. As aves foram submetidas ao estresse cíclico por calor durante 8 horas diárias até o final do período experimental, e as temperaturas (Tabela 1) foram baseadas conforme Zeferino et al. (2016). O programa de luz foi adotado conforme as orientações do manual da linhagem e foram fornecidas água e ração à vontade.

As aves foram distribuídas em dois grupos experimentais (45 aves/grupo), sendo um grupo suplementado com 0,9% de óleo da semente de maracujá (OSM) e um grupo

controle (CON) sem a suplementação de OSM. As dietas experimentais foram formuladas a base de milho e farelo de soja (Tabela 2), de acordo com as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2017) para frangos de corte machos de desempenho médio, atendendo as quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 33 dias) e final (34 a 42 dias de idade).

Tabela 1. Temperaturas médias registradas na câmara climática sob estresse cíclico por calor durante o período experimental.

Idade das aves (dias)	Temperatura (°C)
1-7	35,26
8-21	33,08
22-35	31,54
36-42	30,01

2.2. Coleta das amostras

Aos 36 dias de idade, 18 aves selecionadas aleatoriamente (1 ave/gaiola) foram mantidas em jejum de oito horas e posteriormente foram sacrificadas por deslocamento cervical. Em seguida foram coletadas amostras de filé de peito (músculo *Pectoralis major*) de cada ave e armazenadas em freezer -80° até a realização dos ensaios proteômicos. Para a análise proteômica foram feitos 3 *pools* por tratamento e cada *pool* foi composto por amostras de 3 animais diferentes de acordo com os grupos estudados.

2.3. Extração e quantificação das proteínas

Para a extração das proteínas foram homogeneizados aproximadamente 100 mg de cada *pool* de tecido muscular em tampão de lise (uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, ditiotretitol 40 mmol L⁻¹ e bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹) por sonicação em gelo (20% de amplitude), com 5 pulsos de 1 minuto cada e intervalo de 1 minuto entre cada pulso. Em seguida os extratos foram centrifugados durante 20 minutos, a 14 000 xg e 12°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Posteriormente as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 33 dias de idade) e final (34 a 42 dias de idade).

INGREDIENTES	Pré-Inicial					Inicial				
	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
Milho	54,52	54,55	54,58	54,60	54,63	56,26	56,30	56,32	56,34	56,37
Farelo de soja, 46%	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	34,00	34,00	34,00	34,00	34,00
Óleo soja	1,057	0,725	0,503	0,282	0,060	1,899	1,567	1,346	1,124	0,903
Farinha de vísceras	4,766	4,761	4,757	4,754	4,751	4,487	4,482	4,479	4,476	4,472
Fosfato bicálcico	1,263	1,263	1,264	1,264	1,265	1,080	1,081	1,081	1,082	1,082
Calcário	0,843	0,843	0,843	0,844	0,844	0,765	0,765	0,765	0,765	0,765
Bicarbonato de Sódio	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035
OSM ¹	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,367	0,367	0,367	0,367	0,366	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
L-Lisina HCL 99%	0,227	0,227	0,227	0,227	0,227	0,233	0,233	0,233	0,233	0,233
L-Treonina 98,5%	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092
Anticoccidiano ²	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095
Premix Vit. ³	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. ⁴	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição nutricional calculada										
EM (kcal/kg)	2975	2975	2975	2975	2975	3050	3050	3050	3050	3050
Proteína Bruta (%)	24,27	24,27	24,27	24,27	24,27	23,31	23,31	23,31	23,31	23,31
Cálcio (%)	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,878	0,878	0,878	0,878	0,878
Fósforo disp. (%)	0,463	0,463	0,463	0,463	0,463	0,419	0,419	0,419	0,419	0,419
Potássio (%)	0,597	0,597	0,597	0,597	0,597	0,598	0,598	0,598	0,598	0,598
Sódio (%)	0,225	0,225	0,225	0,225	0,225	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218
Cloro (%)	0,202	0,202	0,202	0,202	0,202	0,194	0,194	0,194	0,194	0,194
Lisina dig. (%)	1,441	1,441	1,441	1,441	1,441	1,384	1,384	1,384	1,384	1,384
Metionina (%)	0,591	0,591	0,591	0,591	0,591	0,567	0,567	0,567	0,567	0,567
Met+Cys dig. (%)	1,066	1,066	1,066	1,066	1,066	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024
Triptofano (%)	0,259	0,259	0,259	0,259	0,259	0,249	0,249	0,249	0,249	0,249
Treonina (%)	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,955	0,955	0,955	0,955	0,955

INGREDIENTES	Crescimento					Final				
	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
Milho	61,43	61,47	61,50	61,52	61,54	66,89	66,93	66,96	66,99	67,01
Farelo de soja, 46%	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	25,80	25,79	25,78	25,78	25,78
Óleo soja	2,973	2,640	2,419	2,198	1,976	2,916	2,583	2,360	2,138	1,916
Farinha de vísceras	2,273	2,268	2,265	2,261	2,258	1,462	1,461	1,461	1,460	1,460
Fosfato bicálcico	1,170	1,170	1,171	1,171	1,171	0,890	0,890	0,890	0,890	0,890
Calcário	0,678	0,678	0,678	0,678	0,678	0,660	0,660	0,661	0,661	0,661
Bicarbonato de Sódio	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
OSM ¹	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,314	0,314	0,314	0,314	0,314	0,275	0,275	0,275	0,275	0,275
L-Lisina HCL 99%	0,257	0,257	0,257	0,257	0,257	0,271	0,271	0,271	0,272	0,272
L-Treonina 98,5%	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091	0,082	0,082	0,082	0,082	0,082
Anticoccidiano ²	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	-	-	-	-	-
Premix Vit. ³	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. ⁴	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Composição nutricional calculada

EM (kcal/kg)	3150	3150	3150	3150	3150	3200	3200	3200	3200	3200
Proteína Bruta (%)	20,58	20,58	20,58	20,58	20,58	18,57	18,57	18,57	18,57	18,57
Cálcio (%)	0,758	0,758	0,758	0,758	0,758	0,634	0,634	0,634	0,634	0,634
Fósforo disp. (%)	0,374	0,374	0,374	0,374	0,374	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296
Potássio (%)	0,599	0,599	0,599	0,599	0,599	0,593	0,593	0,593	0,593	0,593
Sódio (%)	0,208	0,208	0,208	0,208	0,208	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197
Cloro (%)	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,172	0,172	0,172	0,172	0,172
Lisina dig. (%)	1,239	1,239	1,239	1,239	1,239	1,118	1,118	1,118	1,118	1,118
Metionina (%)	0,508	0,508	0,508	0,508	0,508	0,458	0,458	0,458	0,458	0,458
Met+Cys dig. (%)	0,917	0,917	0,917	0,917	0,917	0,827	0,827	0,827	0,827	0,827
Triptofano (%)	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201
Treonina (%)	0,855	0,855	0,855	0,855	0,855	0,771	0,771	0,771	0,771	0,771

¹OSM= Óleo da semente de maracujá; ² Salinomicina (66ppm); ³Premix vitamínico (níveis de garantia/kg de ração): Vitamina A (min) 10.000 U.I.; Vitamina D3 (min) 2.500 U.I.; Vitamina E (min) 17,5 U.I.; Vitamina K3 (min) 2 mg; Vitamina B1 (min) 1,5 mg; Vitamina B2 (min) 7,5 mg; Niacina (min) 25 mg; Ácido pantotênico 15 mg; Vitamina B6 (min) 2 mg; Ácido fólico (min) 0,5 mg; Biotina (min) 60 mcg; Vitamina B12 (min) 15 mcg; ⁴Premix Mineral (níveis de garantia/kg de ração): Ferro (min) 30 mg; Cobre (min) 6 mg; Manganês (min) 70 mg; Zinco (min) 50 mg; Iodo (min) 1 mg; Selênio (min) 0,35 mg; Cobalto (min) 0,2 mg.

2.4. Digestão das proteínas em solução

A partir dos extratos proteicos, 50 µg de proteína de cada amostra foi diluída em 60 µL de bicarbonato de amônio (50 mmol L⁻¹). Em seguida foram adicionados 25 µL de Rapigest (0,2% (v/v)) em cada amostra e transferidas para bloco aquecido a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente, as proteínas presentes nas amostras foram reduzidas com a adição de 2,5 µL de ditioneitol (100 mmol L⁻¹) sendo incubadas (37°C) por 40 minutos, e posteriormente alquiladas por meio da adição de 2,5 µL de iodoacetamida (300 mmol L⁻¹). Logo após as etapas de redução e alquilação, os extratos proteicos foram incubados em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. Na sequência foram adicionados 10 µL de solução de tripsina na concentração de 0,1 µg µL⁻¹ (1:50 [enzima:substrato]) procedendo-se imediatamente a digestão a 37°C por 16 horas.

A digestão foi interrompida com 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) e as amostras foram incubadas novamente durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14 000 xg por 30 minutos em temperatura ambiente. Logo após a centrifugação os sobrenadantes foram separados e transferidos para um novo microtubo. As amostras foram dessalinizadas por meio de cartuchos Sep-Pak Vac C18 (Waters, Milford, EUA) conforme as recomendações do fabricante. As soluções contendo os peptídeos foram reduzidas por meio de centrifugação a vácuo e armazenadas a -20°C até a análise por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS).

2.5. Identificação e análise de expressão das proteínas

A análise dos peptídeos foi realizada por LC-MS/MS utilizando sistema *nanoAcquity UPLC Xevo QTOF G2 MS* (Waters, Manchester, UK). O software *Protein Lynx Global Server (PLGS)* foi utilizado para o processamento e pesquisa dos dados LC-MS e a partir do algoritmo de Monte-Carlo as proteínas foram identificadas utilizando o banco de dados *Uniprot* para *Gallus Gallus*. Para a análise quantitativa do proteoma pelo software PLGS, foram consideradas apenas proteínas com pontuação de confiança superior a 95%. Na análise comparativa entre os grupos (OSM versus CON) foram consideradas proteínas reguladas negativamente (*downregulated*) quando $P < 0,05$ e proteínas reguladas positivamente (*upregulated*) quando $1 - P > 0,95$.

2.6. Análise de bioinformática

A análise funcional das proteínas *upregulated* e *downregulated* foi realizada utilizando o software *Blast2GO* v.6.0.3 a partir das sequências *FASTA* das proteínas obtidas no banco de dados *Uniprot*. Por meio os termos *GO* (*Gene Ontology*) as proteínas foram classificadas em três níveis: processo biológico, função molecular e componente celular. A ferramenta online *String* (string-db.org v.11.5) foi utilizada para construir a rede de interação proteína-proteína utilizando o nível de confiança mais alto (0,900). A rede foi agrupada em 3 clusters utilizando o agrupamento *kmeans*. Os nós desconectados na rede foram ocultados. A análise de enriquecimento da via *KEGG* (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto) foi realizada utilizando o software *Cytoscape* (v.3.9.1) com o plugin *String* para avaliar as vias metabólicas alteradas ($FDR < 0,05$) pelas proteínas diferencialmente expressas.

3. Resultados

A abordagem proteômica utilizada no presente estudo revelou a modulação de 57 proteínas no músculo *Pectoralis major* de frangos de corte expostos ao estresse cíclico por calor. Dentre elas, 4 proteínas foram reguladas positivamente e 46 proteínas foram reguladas negativamente no grupo suplementado com 0,9% de OSM. Além disso, 7 proteínas foram expressas unicamente no grupo controle. Foram discutidas apenas proteínas relevantes para compreensão dos efeitos do OSM em condições de estresse térmico calórico. Nas tabelas 3 e 4 estão apresentadas as proteínas diferencialmente expressas estando agrupadas de acordo com os processos biológicos nas quais estão envolvidas.

Na tabela 5 estão apresentadas as 17 vias metabólicas significativamente enriquecidas pelo *KEGG*, construída por meio do software *Cytoscape* com o plugin *String* (glicólise/gliconeogênese, biossíntese de aminoácidos, metabolismo do carbono, contração do músculo cardíaco, junção estreita, regulação do citoesqueleto de actina, sinalização adrenérgica em cardiomiócitos, junção aderente, via de sinalização do cálcio, contração do músculo liso vascular, vias metabólicas, fagossomo, adesão focal, via de sinalização da apelina, apoptose, metabolismo da frutose e manose e metabolismo do piruvato). Essas vias metabólicas alteradas demonstram as principais funções desempenhadas pelas proteínas analisadas por meio da modulação do OSM na dieta de frangos de corte em situação de estresse cíclico por calor.

Tabela 3. Proteínas *upregulated* (Up) ou *downregulated* (Down) no grupo suplementado com 0,9% de OSM em comparação com o grupo controle sem suplementação de OSM em condições de estresse cíclico por calor.

Accession	Protein name	Gene	PLGS Score	Expressão*
<i>Resposta ao estresse oxidativo</i>				
Q8UW59	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	PARK7	397.92	Down
Q00649	Heat shock protein beta-1	HSPB1	902.71	Up
<i>Neurofilamento</i>				
P16053	Neurofilament medium polypeptide	NEFM	99.6	Down
<i>Ligação de íons de cálcio</i>				
P19204	Calsequestrin-2	CASQ2	1084.96	Down
P62149	Calmodulin	CALM	735.31	Down
P05419	Neo-calmodulin	-	735.31	Down
P13585	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	ATP2A1	1124.05	Down
Q03669	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2	785.43	Down
Q9YGL9	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	ATP2A3	356.58	Down
P02588	Troponin C_ skeletal muscle	TNNC2	6511.26	Down
P05094	Alpha-actinin-1	ACTN1	1537.1	Down
P20111	Alpha-actinin-2	ACTN2	5004.57	Down
P02609	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	MYLPF	25654.27	Down
P02607	Myosin light polypeptide 6	MYL6	3429.56	Up
<i>Apoptose</i>				
P60706	Actin_ cytoplasmic 1	ACTB	18933.58	Down
Q5ZMQ2	Actin_ cytoplasmic 2	ACTG1	18928.62	Down
P53478	Actin_ cytoplasmic type 5	-	18928.62	Down
Q90835	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A	198.99	Down
<i>Glicólise e gliconeogênese</i>				
P00356	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	32662.16	Down
P00940	Triosephosphate isomerase	TPI1	20630.25	Down
P00340	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	13201.98	Down
P53449	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	6259.09	Down
P00548	Pyruvate kinase PKM	PKM	9674.73	Down
Q5ZLN1	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	9787.92	Down
P51903	Phosphoglycerate kinase	PGK	6164.48	Down
P51913	Alpha-enolase	ENO1	1698.57	Down
O57391	Gamma-enolase	ENO2	608.77	Down
P07322	Beta-enolase	ENO3	15290.6	Down
<i>Ligação de ATP</i>				
P00565	Creatine kinase M-type	CKM	8018.11	Down
P11009	Creatine kinase S-type_ mitochondrial	CKMT2	399.79	Down

Q5ZLC5	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	ATP5F1B	189.72	Down
P05081	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	4341.16	Down
P08023	Actin_ aortic smooth muscle	ACTA2	30601.89	Down
P63270	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	ACTG2	29703.31	Down
P68139	Actin_ alpha skeletal muscle	ACTA1	39207.19	Down
P29616	Myosin heavy chain_ cardiac muscle isoform	-	3218.17	Down
<i>Ligação de actina</i>				
P16419	Myosin-binding protein C_ fast-type	MYBPC2	865.43	Up
Q90688	Myosin-binding protein C_ cardiac-type	MYBPC3	60.61	Down
Q05623	Myosin-binding protein H	MYBPH	446.99	Down
P02565	Myosin-1B	MYH1B	12928.8	Down
P14105	Myosin-9	MYH9	190.06	Down
P10587	Myosin-11	MYH11	188.9	Down
P13538	Myosin heavy chain_ skeletal muscle_ adult	-	22295.29	Down
Q02173	M-protein_ striated muscle	-	401.9	Down
P04268	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	12345.12	Down
P19352	Tropomyosin beta chain	TPM2	1399.48	Down
<i>Contração cardíaca</i>				
P68034	Actin_ alpha cardiac muscle 1	ACTC1	32225.84	Down
P02606	Myosin light chain 1_ cardiac muscle	-	3402.23	Up
P68246	Troponin I_ fast skeletal muscle	TNNI2	5471.26	Down
<i>Transporte de oxigênio</i>				
P02112	Hemoglobin subunit beta	HBB	893.2	Down

*Proteínas *Dowregulated*: valor de $P < 0.05$; Proteínas *Upregulated*: valor de $P > 0.95$.

Tabela 4. Proteínas expressas unicamente no grupo controle (CON).

Accession	Protein name	Gene	PLGS Score	Expressão
P24045	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-4	GABRB4	23.24	CON
P19019	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3	GABRB3	34.36	CON
Q90872	Interferon type A3	IFNA3	164.19	CON
P98150	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	NFKB2	52.78	CON
P09207	Tubulin beta-6 chain	-	18.93	CON
Q90665	Semaphorin-4D	SEMA4D	65.54	CON
Q90631	Kinectin	KTN1	31.14	CON

Tabela 5. Vias *KEGG* significativamente enriquecidas ($FDR < 0,05$) utilizando o *software Cytoscape* com o plugin *String*.

Pathway	Description	FDR	Genes
gga00010	Glycolysis/Gluconeogenesis	6.56E-12	ENO1 PGK1 GAPDH TPI1 ENO2 PKM2 LDHA PGAM1 ALDOC
gga01230	Biosynthesis of amino acids	7.79E-10	ENO1 PGK1 GAPDH TPI1 ENO2 PKM2 PGAM1 ALDOC
gga01200	Carbon metabolism	2.85E-08	ENO1 PGK1 GAPDH TPI1 ENO2 PKM2 PGAM1 ALDOC
gga04260	Cardiac muscle contraction	2.66E-05	ATP2A3 ACTC1 CASQ2 ATP2A2 MYL3
gga04530	Tight junction	5.25E-05	MYH11 ACTB MYH9 ACTN1 ACTG1 LOC776816
gga04810	Regulation of actin cytoskeleton	2.60E-04	MYH11 ACTB MYH9 ACTN1 ACTG1 LOC776816
gga04261	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	2.70E-04	ATP2A3 ACTC1 CAM ATP2A2 MYL3
gga04520	Adherens junction	5.00E-04	ACTB ACTN1 ACTG1 LOC776816
gga04020	Calcium signaling pathway	0.0016	ATP2A3 TNNC2 CAM CASQ2 ATP2A2
gga04270	Vascular smooth muscle contraction	0.0033	ACTA2 MYH11 CAM MYH9
gga01100	Metabolic pathways	0.0053	ENO1 PGK1 GAPDH TPI1 ENO2 CKMT2 PKM2 LDHA PGAM1 AK1 ALDOC ATP5F1B
gga04145	Phagosome	0.0058	TUBB1 ACTB ACTG1 LOC776816
gga04510	Focal adhesion	0.0174	ACTB ACTN1 ACTG1 LOC776816
gga04371	Apelin signaling pathway	0.034	ACTA2 CAM MYL3
gga04210	Apoptosis	0.0345	ACTB ACTG1 LOC776816
gga00051	Fructose and mannose metabolism	0.0381	TPI1 ALDOC
gga00620	Pyruvate metabolism	0.0381	PKM2 LDHA

A análise da ontologia genética classificou as sequências de proteínas em diversos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares que podem ser observados na Figura 1. 58 processos biológicos foram modulados pela suplementação de OSM, sendo os principais o processo metabólico de substância orgânica (7%), processo metabólico celular (5%), processo metabólico composto de nitrogênio (5%), processo metabólico primário (4%) e processo metabólico de pequenas moléculas (4%). Foi evidenciado 11 funções moleculares das proteínas alteradas no músculo peitoral de frangos suplementados com OSM, sendo as principais a ligação de íons (20%), ligação proteica (14%), ligação de moléculas pequenas (12%), ligação de compostos heterocíclicos (12%) e ligação de compostos cíclicos orgânicos (12%). Foram revelados 31 componentes celulares, dos quais 5 principais envolvidos foram estrutura anatômica intracelular (13%), citoplasma (10%), organela (9%), citosol (7%) e complexo supramolecular (6%).

A rede de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas no músculo de frangos de corte suplementados com OSM foi construída utilizando o programa *String* e o genoma *Gallus gallus* (Figura 2). Essas interações demonstram quais proteínas foram moduladas pela suplementação de OSM e que contribuem conjuntamente para uma função compartilhada. A rede foi agrupada em três clusters, onde é possível identificar a interação entre as proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto (Cluster azul), ligação de actina (cluster verde), glicólise/gliconeogênese e biossíntese de aminoácidos (cluster vermelho).

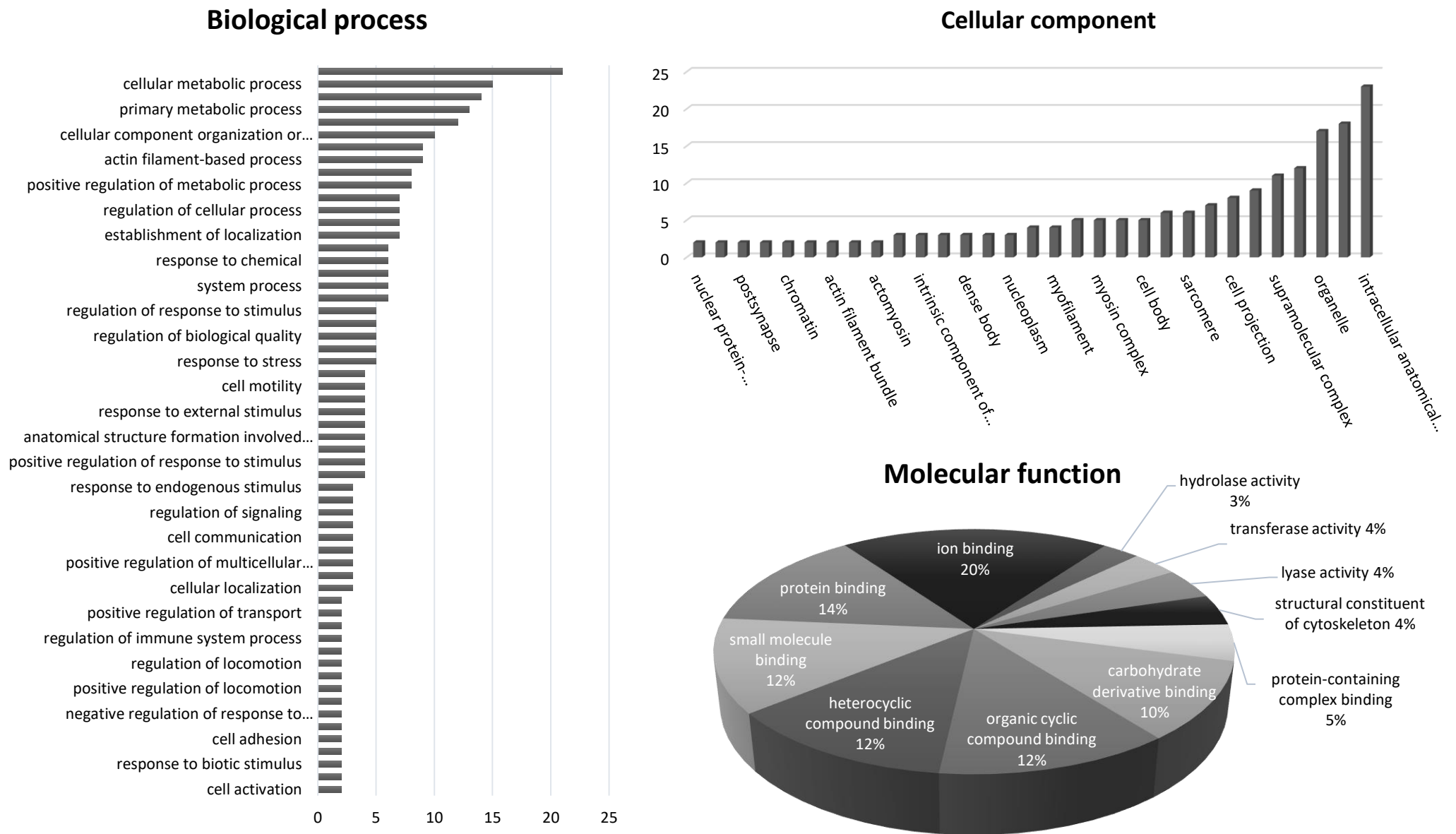


Figura 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular de frangos de corte suplementados com OSM submetidos ao estresse cíclico por calor.

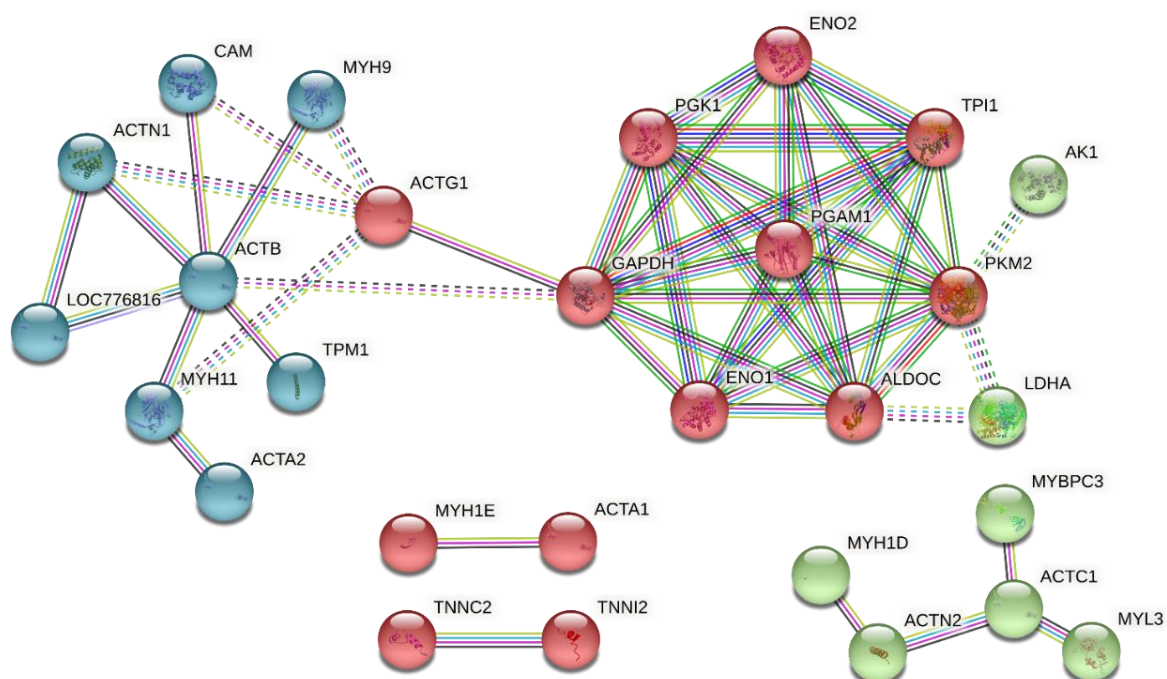


Figura 2. Rede de interação proteína-proteína das proteínas *upregulated* e *downregulated* no tecido muscular de frangos de corte suplementados com OSM. Cluster azul: ACTN1 (Alpha-actinin-1), CAM (Calmodulin), MYH9 (Myosin-9), ACTB (Actin_ cytoplasmic 1), LOC776816 (Actin, cytoplasmic 2), MYH11 (Myosin-9), TPM1 (Tropomyosin alpha-1 chain) e ACTA2 (Actin_ aortic smooth muscle). Cluster vermelho: ACTG1 (Actin_ cytoplasmic 2), GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1), ENO1 (Alpha-enolase), ENO2 (Gamma-enolase), TPI1 (Triosephosphate isomerase), PKM2 (Pyruvate kinase PKM), ALDOC (Fructose-bisphosphate aldolase C), PGAM1 (Phosphoglycerate mutase 1), MYH1E (Myosin, heavy chain 1e, skeletal muscle), ACTA1 (Actin_ alpha skeletal muscle), TNNC2 (Troponin C, skeletal muscle) e TNNI2 (Troponin I_ fast skeletal muscle). Cluster verde: AK1 (Adenylate kinase isoenzyme 1), LDHA (L-lactate dehydrogenase A chain), MYBPC3 (Myosin-binding protein C_ cardiac-type), ACTC1 (Actin_ alpha cardiac muscle 1), MYL3 (Myosin light chain 3), ACTN2 (Alpha-actinin-2) e MYH1D (Myosin heavy chain 1/2/3/4/8/13/7b/15).

4. Discussão

4.1. Resposta ao estresse oxidativo

A *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 (PARK7)* é uma proteína presente no citoplasma e organelas intracelulares, e auxilia na remoção das espécies reativas de oxigênio (EROS), incluindo peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion superóxido, mediante a indução da expressão de diversas enzimas mitocondriais (Clements, McNally,

Conti, Mak, & Ting, 2006; Kinumi, Kimata, Taira, Ariga, & Niki, 2004). A menor expressão da *PARK7* no músculo de frangos suplementados com OSM, sugere que o OSM possivelmente reduziu as EROS por meio de seus compostos antioxidantes, como os polifenóis, α - e β -tocoferol e β -caroteno (Kawakami et al., 2022; Zanetti et al., 2021) diminuindo dessa forma, a necessidade da ação das enzimas antioxidantes endógenas.

Embora não esteja claro, a indução da *Heat shock protein beta-1 (HSPB1)* pode ser outro mecanismo favorecido pelo OSM para controlar o estresse oxidativo. A proteína *HSPB1* é um membro da família de proteínas de choque térmico pequenas envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo a redução da geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (Jung et al., 2017). Esta proteína também pode atenuar a apoptose celular por meio da regulação da liberação de *smac* (caspase derivado de mitocôndrias), que potencializa a apoptose da mitocôndria para o citosol (Narumi et al., 2015). Neste sentido, sob condições de estresse cíclico por calor, a suplementação de OSM pode aumentar a tolerância ao calor em frangos de corte, auxiliando na remoção de EROS e estimulando outros mecanismos de defesa antioxidante.

4.2. Neurofilamento

Os neurofilamentos são polímeros de proteínas, formados por três subunidades de peso molecular leve (NF-L), médio (NF-M) e pesado (NF-H), sendo utilizados como biomarcadores de integridade estrutural neuronal. Em condições fisiológicas normais, os neurofilamentos são constantemente liberados em baixos níveis dos neurônios para o líquido cefalorraquidiano e para o sangue, enquanto níveis acima do normal estão associados a lesões neuronais e neurodegeneração (Yuan & Nixon, 2021). No presente estudo, a subunidade *neurofilament medium polypeptide* foi regulada negativamente no grupo suplementado com OSM. A menor expressão dessa proteína pode estar associada a indução da *Heat shock protein beta-1*, uma vez que a *HSPB1* também está envolvida na sobrevivência de neurônios lesados, catalisando o redobramento de proteínas desnaturadas e inibindo a apoptose (Zochodne, 2014). Desse modo, parece provável que a exposição ao estresse cíclico por calor pode afetar a integridade neuronal, e o OSM atua ativando mecanismos de recuperação e neuroproteção.

4.3. Apoptose

O retículo endoplasmático é uma organela que desempenha diversas funções celulares, incluindo a síntese, dobramento e maturação de proteínas, assim como o principal local de armazenamento e liberação de cálcio intracelular (Bhandary, Marahatta,

Kim, & Chae, 2013). O cálcio, por sua vez, é um dos mensageiros celulares mais importantes, pois atua traduzindo estímulos extracelulares nas vias de sinalização intracelular e regulando o desenvolvimento celular, a sobrevivência, diferenciação e expressão gênica (Li et al., 2014). Alterações no ambiente oxidativo do retículo endoplasmático, como o estresse por calor, favorece a produção de EROS uma vez que situações de estresse no retículo endoplasmático pode afetar a liberação de Ca^{2+} e consequentemente resultar na perda de Ca^{2+} . Este aumento do Ca^{2+} no citosol torna-se um potente ativador da via apoptótica intracelular (Li et al., 2014). Alterações no equilíbrio do Ca^{2+} influencia diversas modificações bioquímicas que levam a ativação de caspase e posterior apoptose celular (Hajnóczky, Davies, & Madesh, 2003). No grupo suplementado com OSM, a maioria das proteínas de ligação de cálcio (Tabela 3) foram expressas negativamente, das quais 4 proteínas principais foram enriquecidas na via de sinalização do cálcio (Tabela 5). Este resultado sugere que por meio de suas propriedades antioxidantes, o OSM contribuiu na menor liberação de Ca^{2+} no citosol e consequentemente na menor ocorrência de apoptose celular em condições de estresse por calor.

Além disso, também foi observado no grupo OSM menor expressão da actina citoplasmática e suas isoformas, e do *Elongation factor 1-alpha 1*. Encontradas tanto no citoplasma como no núcleo, as actinas são responsáveis por diversas funções celulares, atuando na transcrição gênica, tradução de proteínas, morfogênese, dinâmica e mecânica celular, respondendo de forma rápida em diferentes situações por meio de estímulos fisiológicos ou patológicos (Field & Lénárt, 2011; Ren, Zhao, Cao, & Huang, 2021). Evidências sugerem que a actina desempenha papel importante como mediadora e iniciadora das vias de apoptose, estando envolvida na morte celular programada sob diferentes maneiras, incluindo a apoptose, morte celular lisossomal, piroptose, NETose, necroptose, entose, partanatos, ferroptose, autose, alcaliptose e oxeiptose. (Desouza, Gunning, & Stehn, 2012; Kulms et al., 2002; Ren et al., 2021). Partindo do mesmo princípio, o *Elongation factor 1-alpha 1* apresenta múltiplos papéis biológicos, atuando na síntese proteica, organização do citoesqueleto e polimerização da actina, sendo regulado em situações de transformação, envelhecimento ou interrupção no crescimento (Duttaroy, Bourbeau, Wang, & Wang, 1998). Duttaroy, Bourbeau, Wang & Wang (1998) demonstraram que a baixa expressão da proteína homóloga *EF-1 α* em ratos fornece proteção significativa contra a morte celular apoptótica, enquanto a superexpressão aumenta a velocidade da morte celular. Estes resultados reforçam a hipótese de que o

OSM atuou na redução do estresse oxidativo, desencadeando uma cascata de eventos associados a proteção celular contra a apoptose em situações de exposição ao estresse cíclico por calor.

4.4. Via de ativação do fator de transcrição *NF-κB*

O estresse oxidativo é capaz de ativar vários fatores e vias de transcrição, incluindo *Nrf2*, *NF-κB*, *AP1*, *PGC-1α*, *p53* como forma de controlar a produção excessiva de EROS (Sahin et al., 2019; Surai, Kochish, Fisinin, & Kidd, 2019; Wang & Hai, 2016). No presente estudo, a proteína *Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit (NFKB2)* foi expressa unicamente no grupo sem a suplementação do OSM. O fator de transcrição *NF-κB* é importante em vários processos celulares, incluindo inflamação, imunidade, proliferação celular e apoptose (Gloire, Legrand-Poels, & Piette, 2006). A via de ativação de *NF-κB* é induzida por vários mediadores da imunidade inata e adaptativa, como citocinas pró-inflamatórias (Gloire, Legrand-Poels, & Piette, 2006). Também foi observado expressão única do *Interferon type A3 (IFNA3)* no grupo sem o OSM, possivelmente devido a expressão do *NFKB2*. O *NF-κB* promove a diferenciação de células Th1 (células T auxiliares), e estas por sua vez são caracterizadas pela secreção de *IFN-γ* (interferon tipo 3), uma citocina que promove a imunidade celular e participa de processos inflamatórios (Liu, Zhang, Joo, & Sun, 2017). Como observado no presente estudo pela expressão da *NFKB2* e *IFNA3* unicamente no grupo sem OSM, Ma et al. (2019) também verificaram que o aumento de citocinas pró-inflamatórias indicam que a resposta imune inata e a resposta inflamatória são induzidas pelo estresse térmico calórico. Possivelmente, no grupo suplementado com OSM a via do *NF-κB* não foi ativada em função do OSM diminuir os efeitos prejudiciais das EROS, por meio de suas propriedades antioxidantes naturais (polifenóis, caroteno e tocoferol), as quais podem eliminar diretamente as EROS sem a necessidade da ativação de fatores de transcrição e enzimas antioxidantes (Wang & Hai, 2016).

4.5. Metabolismo energético

A regulação das proteínas envolvidas na via glicolítica e gliconeogênese está relacionada com o estabelecimento da homeostasia no organismo das aves de produção, conforme indicado em pesquisas recentes (Cai et al., 2018; Ning et al., 2019; X. Zhang et al., 2020). Sob condições de estresse calórico o tecido muscular é catabolizado a substratos de aminoácidos para fornecer energia via gliconeogênese hepática, como observado por Ma et al. (2021). No geral, a suplementação de OSM resultou na menor

expressão das proteínas envolvidas nas vias da glicólise/gliconeogênese. Possivelmente a ação do OSM no controle do estresse oxidativo, diminuiu a demanda energética dos frangos de corte para combater os efeitos deletérios do estresse por calor. Além disso, as proteínas *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Triosephosphate isomerase*, *Fructose-bisphosphate aldolase C*, *Pyruvate kinase PKM*, *Phosphoglycerate mutase 1*, *Phosphoglycerate kinase*, *Alpha-enolase*, *Gamma-enolase* e *Beta-enolase* também estão envolvidas na biossíntese de aminoácidos (Tabela 5), e a regulação negativa dessa proteínas sugere menor degradação do tecido muscular para a geração de energia via aminoácidos. Este fator pode favorecer melhor qualidade de carne dos frangos suplementados com OSM, uma vez que a maior expressão das proteínas glicolíticas como *Phosphoglycerate mutase 1*, *Triosephosphate isomerase*, *Phosphoglycerate kinase* e *beta-enolase* no músculo *Pectoralis major* foram associadas com defeitos de qualidade da carne, principalmente miopatias (*White striping* e *Wooden breast*) e carnes PSE (pálida, flácida e exsudativa) (Cai et al., 2018; Desai et al., 2016; Kuttappan et al., 2017).

5. Conclusão

O fracionamento do proteoma muscular de frangos de corte suplementados com OSM demonstrou provável mecanismo adaptativo para aumentar a tolerância ao calor, possivelmente em virtude do auxílio na remoção de EROS (*PARK7* e *HSPB1*) e pelo estímulo de outros mecanismos de defesa antioxidante que, conseqüentemente, reduziram o estresse oxidativo. Os resultados do presente estudo sugerem que o OSM ativou mecanismos de recuperação e neuroproteção (*NEFM*), bem como eventos associados a proteção celular pela menor ocorrência de apoptose celular (proteínas de ligação de cálcio, actinas citoplasmáticas e suas isoformas e *EEF1A*). O OSM também demonstrou atenuar possíveis respostas inflamatórias (*NFKB2* e *IFNA3*) e possivelmente promoveu a regulação do metabolismo energético por meio da menor expressão das proteínas envolvidas nas vias da glicólise/gliconeogênese.

6. Referências

Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Arif, M., Taha, A. E., & Noreldin, A. E. (2019). Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *Journal of Thermal Biology*, 79 (September 2018), 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.013>

- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., ... González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866–1874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2013). An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 434–456. <https://doi.org/10.3390/ijms14010434>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cai, K., Shao, W., Chen, X., Campbell, Y. L., Nair, M. N., Suman, S. P., ... Schilling, M. W. (2018). Meat quality traits and proteome profile of woody broiler breast (*pectoralis major*) meat. *Poultry Science*, 97, 337–346. <https://doi.org/10.3382/ps/pex284>
- Cao, C., Xiao, Z., Ge, C., & Wu, Y. (2020). Application and Research Progress of Proteomics in Chicken Meat Quality and Identification: A Review. *Food Reviews International*, 00(00), 1–22. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1733594>
- Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W., & Ting, J. P. Y. (2006). DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15091–15096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607260103>
- Dembitsky, V. M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44, 1671–1701. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.003>
- Desai, M. A., Jackson, V., Zhai, W., Suman, S. P., Nair, M. N., Beach, C. M., & Schilling, M. W. (2016). Proteome basis of pale, soft, and exudative-like (PSE-like) broiler

- breast (*Pectoralis major*) meat. *Poultry Science*, 95(11), 2696–2706.
<https://doi.org/10.3382/ps/pew213>
- Desouza, M., Gunning, P. W., & Stehn, J. R. (2012). The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis Melissa. *BioArchitecture*, 2(3), 75–87.
<https://doi.org/10.4161/bioa.20975>
- Duttaroy, A., Bourbeau, D., Wang, X. L., & Wang, E. (1998). Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 α . *Experimental Cell Research*, 238(1), 168–176.
<https://doi.org/10.1006/excr.1997.3819>
- Field, C. M., & Lénárt, P. (2011). Bulk cytoplasmic actin and its functions in meiosis and mitosis. *Current Biology*, 21(19), 825–830.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.043>
- Gilmore, J. M., & Washburn, M. P. (2010). Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. *Journal of Proteomics*, 73(11), 2078–2091.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.08.005>
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. (2006). NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493–1505.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.04.011>
- Guglielmetti, C., Manfredi, M., Brusadore, S., Sciuto, S., Esposito, G., Ubaldi, P. G., Mazza, M. (2018). Two-dimensional gel and shotgun proteomics approaches to distinguish fresh and frozen-thawed curled octopus (*Eledone cirrhosa*). *Journal of Proteomics*, 186(July), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.017>
- Hajnóczky, G., Davies, E., & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 445–454.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00616-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00616-8)
- He, J., Xia, C., He, Y., Pan, D., Cao, J., Sun, Y., & Zeng, X. (2019). Proteomic responses to oxidative damage in meat from ducks exposed to heat stress. *Food Chemistry*, 295(May), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.073>
- Huang, C., Hou, C., Ijaz, M., Yan, T., Li, X., Li, Y., & Zhang, D. (2020). Proteomics discovery of protein biomarkers linked to meat quality traits in post-mortem muscles:

- Current trends and future prospects: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 105(April), 416–432. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.030>
- Jiang, S., Mohammed, A. A., Jacobs, J. A., Cramer, T. A., & Cheng, H. W. (2020). Effect of synbiotics on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress. *Poultry Science*, 99(1), 142–150. <https://doi.org/10.3382/ps/pez571>
- Joo, S. T., Kim, G. D., Hwang, Y. H., & Ryu, Y. C. (2013). Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*, 95(4), 828–836. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.044>
- Jung, U. S., Kim, M. J., Wang, T., Lee, J. S., Jeon, S. W., Jo, N. C., Lee, H. G. (2017). Upregulated heat shock protein beta-1 associated with caloric restriction and high feed efficiency in longissimus dorsi muscle of steer. *Livestock Science*, 202(September 2016), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.05.009>
- Kawakami, S., Morinaga, M., Tsukamoto-Sen, S., Mori, S., Matsui, Y., & Kawama, T. (2022). Constituent characteristics and functional properties of passion fruit seed extract. *Life*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/life12010038>
- Kinumi, T., Kimata, J., Taira, T., Ariga, H., & Niki, E. (2004). Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(3), 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.110>
- Kulms, D., Düßmann, H., Pöppelmann, B., Ständer, S., Schwarz, A., & Schwarz, T. (2002). Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death and Differentiation*, 9(6), 598–608. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401002>
- Kuttappan, V. A., Bottje, W., Ramnathan, R., Hartson, S. D., Coon, C. N., Kong, B. W., Hargis, B. M. (2017). Proteomic analysis reveals changes in carbohydrate and protein metabolism associated with broiler breast myopathy. *Poultry Science*, 96(8), 2992–2999. <https://doi.org/10.3382/ps/pex069>
- Lara, L. J., & Rostagno, M. H. (2013). Impact of heat stress on poultry production. *Animals*, 3(2), 356–369. <https://doi.org/10.3390/ani3020356>

- Li, L., Tan, H., Gu, Z., Liu, Z., Geng, Y., Liu, Y., Su, L. (2014). Heat stress induces apoptosis through a Ca^{2+} -mediated mitochondrial apoptotic pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Plos One*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111083>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(March). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Ma, B., Zhang, L., Li, J., Xing, T., Jiang, Y., & Gao, F. (2021). Heat stress alters muscle protein and amino acid metabolism and accelerates liver gluconeogenesis for energy supply in broilers. *Poultry Science*, 100(1), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.090>
- Ma, D., Liu, Q., Zhang, M., Feng, J., Li, X., Zhou, Y., & Wang, X. (2019). iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of the spleen reveals innate immunity and cell death pathways associated with heat stress in broilers (*Gallus gallus*). *Journal of Proteomics*, 196(September 2018), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.01.012>
- Mouzo, D., Rodríguez-Vázquez, R., Lorenzo, J. M., Franco, D., Zapata, C., & López-Pedrouso, M. (2020). Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review. *Trends in Food Science and Technology*, 99(March), 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.029>
- Narumi, T., Shishido, T., Otaki, Y., Kadowaki, S., Honda, Y., Funayama, A., Kubota, I. (2015). High-mobility group box 1-mediated heat shock protein beta 1 expression attenuates mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 82, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.018>
- Ning, H., Cui, Y., Song, X., Chen, L., Yin, Z., Hua, L., Ge, Y. (2019). iTRAQ-based proteomic analysis reveals key proteins affecting cardiac function in broilers that died of sudden death syndrome. *Poultry Science*, 98(12), 6472–6482. <https://doi.org/10.3382/ps/pez532>
- Qiu, W., Su, W., Cai, Z., Dong, L., Li, C., Xin, M., Wu, Z. (2020). Combined Analysis of Transcriptome and Metabolome Reveals the Potential Mechanism of Coloration and Fruit Quality in Yellow and Purple *Passiflora edulis* Sims. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 12096–12106.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03619>
- Ren, W., Zhao, W., Cao, L., & Huang, J. (2021). Involvement of the Actin Machinery in Programmed Cell Death. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(February).
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.634849>
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M. I., Donzele, J. L., Sakomura, N. S., Perazzo, F. G., ... Brito, C. O. (2017). *Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos*. (Horacio Santiago Rostagno, Ed.) (4th ed.). Viçosa: Departamento de Zootecnia, UFV.
- Sahin, K., Yenice, E., Bilir, B., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., Kucuk, O. (2019). Genistein prevents development of spontaneous ovarian cancer and inhibits tumor growth in hen model. *Cancer Prevention Research*, 12(3), 135–145.
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0289>
- Silva, A. C. da, & Jorge, N. (2016). Bioactive compounds of oils extracted from fruits seeds obtained from agroindustrial waste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4), 1–5. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600024>
- Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., & Kidd, M. T. (2019). Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants*, 8(7), 1–36.
<https://doi.org/10.3390/antiox8070235>
- Tang, S., Yin, B., Xu, J., & Bao, E. (2018). Rosemary reduces heat stress by inducing CRYAB and HSP70 expression in broiler chickens. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7014126>
- Wang, X., & Hai, C. (2016). Novel insights into redox system and the mechanism of redox regulation. *Molecular Biology Reports*, 43(7), 607–628.
<https://doi.org/10.1007/s11033-016-4022-y>
- Xing, T., Wang, C., Zhao, X., Dai, C., Zhou, G., & Xu, X. (2017). Proteome Analysis Using Isobaric Tags for Relative and Absolute Analysis Quantitation (iTRAQ) Reveals Alterations in Stress-Induced Dysfunctional Chicken Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2913–2922.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05835>

- Yang, C., Luo, P., Chen, S. jian, Deng, Z. chao, Fu, X. liang, Xu, D. ning, Liu, W. jun. (2021). Resveratrol sustains intestinal barrier integrity, improves antioxidant capacity, and alleviates inflammation in the jejunum of ducks exposed to acute heat stress. *Poultry Science*, 100(11), 101459. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101459>
- Yuan, A., & Nixon, R. A. (2021). Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Frontiers in Neuroscience*, 15(September). <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.689938>
- Zanetti, L. H., Granero, L., Da Luz, P. A., Poletto, M., Lala, B., Delbem, N. L. C., Sartori, J. R. (2021). Chemical, Physical And Oxidative Characteristics Of Broilers Meat Supplemented With Passion Fruit Seed Oil. *International Journal for Innovation Education and Research*, 9(12), 69–83. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol9.iss12.3555>
- Zanetti, L. H., Murakami, A. E., Diaz-Vargas, M., Guerra, A. F., Ospina-Rojas, I. C., Nascimento, G. R., ... Pinto, P. T. M. (2017). BY-PRODUCT OF PASSION FRUIT SEED (*Passiflora edulis*) IN THE DIET OF BROILERS. *Canadian Journal of Animal Science*, 98, 109–118. <https://doi.org/10.1139/cjas-2016-0210>
- Zeferino, C. P., Komiyama, C. M., Pelícia, V. C., Fascina, V. B., Aoyagi, M. M., Coutinho, L. L., Moura, A. S. A. M. T. (2016). Carcass and meat quality traits of chickens fed diets concurrently supplemented with vitamins C and E under constant heat stress. *Animal*, 10(1), 163–171. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001998>
- Zhang, J., Cao, J., Geng, A., Wang, H., Chu, Q., Yang, L., Liu, H. (2021). Comprehensive Proteomic Characterization of the Pectoralis Major at Three Chronological Ages in Beijing-You Chicken. *Frontiers in Physiology*, 12(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.658711>
- Zhang, X., Zhai, W., Li, S., Suman, S. P., Chen, J., Zhu, H., Schilling, M. W. (2020). Early postmortem proteome changes in normal and woody broiler breast muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 11000–11010. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03200>
- Zheng, H. T., Zhuang, Z. X., Chen, C. J., Liao, H. Y., Chen, H. L., Hsueh, H. C., Chen, C. F., Chen, S. E., & Huang, S. Y. (2021). Effects of acute heat stress on protein expression and histone modification in the adrenal gland of male layer-type country

chickens. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85868-1>

Zhuang, Z. X., Chen, S. E., Chen, C. F., Lin, E. C., & Huang, S. Y. (2019). Genome-wide association study on the body temperature changes of a broiler-type strain Taiwan country chickens under acute heat stress. *Journal of Thermal Biology*, 82(March), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.03.007>

Zochodne, D. W. (2014). *Mechanisms of diabetic neuron damage: Molecular pathways*. Handbook of Clinical Neurology (1st ed., Vol. 126). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00028-X>

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

Com base nas condições propostas no presente estudo, a suplementação de OSM durante estresse térmico demonstrou atenuar os efeitos prejudiciais que o estresse por calor pode causar nos tecidos hepático e muscular de frangos de corte. O esclarecimento dos prováveis mecanismos moleculares de atuação das *HSPs* e das possíveis mudanças nas vias metabólicas dessas proteínas, frente às respostas ao estresse térmico em frangos de corte, fortalece a necessidade de estudos posteriores para melhor entendimento de futuros biomarcadores de estresse e de qualidade de carne para melhor eficiência produtiva e bem-estar na avicultura industrial.

Sugere-se a recomendação de 0,9% do OSM nas dietas de frangos de corte quando submetidos em condições de estresse térmico calórico. No proteoma hepático e muscular, a adição de 0,9% de OSM demonstrou efeitos promissores na modulação do sistema antioxidante dos frangos de corte. Essa suplementação é baseada no efeito positivo das *HSPs* no fígado e pelos mecanismos citoprotetores demonstrados no músculo durante estresse térmico. No entanto, para pesquisas futuras em experimentos científicos, torna-se interessante verificar a possível adição de níveis maiores dependendo da gravidade do status fisiológico da ave em condições normais ou não.

O estudo do transcriptoma, metaboloma, epigenoma e proteoma permite identificar condições moleculares que podem acontecer quando a ave recebe sinais dos nutrientes ou de um estímulo estressante. Desta forma, para complementar e se tornar válido o modo de ação do OSM como aditivo fitogênico em pesquisas futuras, recomenda-se a integração das técnicas moleculares ômicas (transcriptômica, metabolômica, epigenômica, proteômica) e da bioinformática, pois essas técnicas permitem visualizar todas as possibilidades de um efeito nutricional no metabolismo da célula, tornando possível em pesquisas avícolas observar as conexões e/ou interações esperadas e não esperadas de um efeito nutricional no frango de corte.

Ambas as técnicas proteômicas (*2D-PAGE* e *Shotgun*) possuem limitações. No entanto, as diferentes abordagens proteômicas adotadas nos tecidos musculares e hepáticos utilizados nesta pesquisa demonstram potencial quando analisadas em conjunto, na qual podem indicar uma explicação e visualização completa de proteomas distintos na produção avícola. No entanto, se possível, é necessário que haja redução de grupos experimentais independente da estratégia proteômica utilizada, porque a análise

de expressão das proteínas pode ser um fator que dificulte conclusões de determinada via molecular em função das proteínas diferencialmente expressas.

As estratégias bioanalíticas adotadas na presente pesquisa possuem relevância em estudos futuros na colaboração e compreensão da qualidade da carne de frangos de corte. O fracionamento do proteoma do tecido muscular do filé de peito (músculo *Pectoralis major*), permite entender o crescimento e desenvolvimento muscular e sugerir na identificação de possíveis biomarcadores proteicos associados com a coloração, capacidade de retenção de água, maciez e pH que são indicadores de defeitos de qualidade de carne. Adicionalmente, por meio do proteoma de ambos os tecidos (músculo e fígado), esse estudo contribui em pesquisas futuras em relação ao modo de ação do OSM como aditivo fitogênico e aumenta o conhecimento do uso dos aditivos naturais na prática industrial para substituição dos antibióticos promotores de crescimento em dietas avícolas.