


## Efecto de la hesperidina añadida a las dietas de codorniz sobre los gases en sangre, la bioquímica sérica y HSP 70 bajo estrés por calor



Abdullah Özbilgin<sup>a\*</sup>

Aykut Özgür<sup>b</sup>

Onur Başbuğ<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Sivas Cumhuriyet University Veterinary Faculty, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disorders. Sivas, Turkey.

<sup>b</sup> Gaziosmanpaşa University. Artova Vocational School. Laboratory and Veterinary Health Program. Tokat, Turkey.

<sup>c</sup> Sivas Cumhuriyet University. Department of Veterinary Internal Medicine. Veterinary Medicine Faculty. Sivas, Turkey.

\*Autor de correspondencia: [abdullahozbilgin@gmail.com](mailto:abdullahozbilgin@gmail.com)

### Resumen:

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos del flavonoide, que es un producto de la producción de cítricos, sobre los parámetros sanguíneos y la concentración de HSP70 en codornices aplicado en condiciones termoneutrales y de estrés por calor. En este contexto, 160 codornices (*Coturnix coturnix japonica*, macho), de 6 semanas de edad y 150-200 g de peso vivo, se alojaron en jaulas durante 1 semana de ejercicio y 5 semanas de período de ensayo. El diseño del estudio constó de 4 grupos de 40 animales y 4 subgrupos con 10 animales en cada grupo. La agrupación se realizó en forma de 2x2. Los grupos termoneutrales ( $24 \pm 0.1$  °C) son NC (0 g de hesperidina/kg de alimento base) y NHES3 (3 g de hesperidina/kg de alimento base) y los grupos bajo estrés por calor ( $34 \pm 0.1$  °C) son HC (0 g de hesperidina/kg de alimento base) y HHES3 (3 g de hesperidina/kg de alimento base), y se generaron aleatoriamente. En el caso de estrés por calor, las concentraciones de pO<sub>2</sub>, pH, HCO<sub>3</sub> y Cl disminuyeron en el grupo HHES3 en comparación con el grupo HC ( $P < 0.05$ ). La concentración de enzimas ALP mostró una disminución significativa en el grupo HHES3 en comparación con el grupo HC en la condición de estrés por calor. El nivel de proteínas de choque térmico (Hsp70) aumentó

en el suero sanguíneo, tejidos del riñón, hígado y pecho en el grupo HC con estrés celular durante el estrés por calor; sin embargo, la concentración de Hsp70 disminuyó significativamente en el grupo HHES3. Como resultado, se encontraron efectos positivos de la suplementación con hesperidina en la dieta tanto en condiciones de estrés por calor como en termoneutrales.

**Palabras clave:** Flavonoide, Codorniz, Termoneutral, Proteína de choque térmico, Hesperidina.

Recibido: 01/07/2022

Aceptado: 08/04/2023

## Introducción

Distintos factores ambientales pueden causar estrés en la avicultura. La temperatura ambiental es un factor importante en la producción avícola, ya que afecta el rendimiento del animal y causa problemas económicos<sup>(1-4)</sup>. En general, se ha reportado que la temperatura termoneutral es de 16-25 °C en aves de corral<sup>(5)</sup>. Se ha informado que el estrés fisiológico se produce si la temperatura ambiental permanece por encima de la temperatura termoneutral<sup>(6)</sup>. Cuando se expone al estrés, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés) se secreta dependiendo de la hormona (CRH) que secreta corticotropina del hipotálamo. La ACTH proporciona la secreción de corticosteroides y adrenalina. Así, los metabolismos de glucosa, lípidos y proteínas son regulados por la secreción de altas cantidades de corticosteroides en el ambiente como adaptación metabólica durante el estrés por calor<sup>(7-9)</sup>. El metabolismo, la nutrición y las condiciones ambientales son eficaces en el equilibrio ácido-base del cuerpo. Los parámetros más importantes que indican el estado ácido-base de la sangre son el pH sanguíneo, el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y las concentraciones de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Los minerales monovalentes juegan un papel importante para el equilibrio ácido-base<sup>(10-12)</sup>. Los animales mantienen la homeostasis bajo condiciones de estrés por calor a través de la vasodilatación, convección y evaporación<sup>(13)</sup>. Inicialmente, los factores de estrés ambiental alteran el funcionamiento metabólico en las aves de corral y hacen que la producción de glucosa mantenga la homeostasis durante la presencia de factores estresantes. Bajo estrés por calor, los sacos aéreos juegan un papel importante en el intercambio de gases, ya que aumentan la circulación de aire hacia la superficie, lo que resulta en una evaporación que hace que el calor se propague<sup>(14)</sup>.

Debido al estrés, se produce oxidación en la estructura de las proteínas y el ADN en la sangre y los tejidos. Como resultado del estrés por calor, se observa un aumento de las proteínas de choque térmico<sup>(15)</sup>. Las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) son una familia de proteínas producidas por las células en respuesta a factores estresantes que están o no relacionados con la temperatura<sup>(16)</sup>. Las HSP son una familia

importante de proteínas que se han conservado a lo largo de la evolución y se expresan en todos los seres vivos, desde procariontes hasta eucariontes. Las HSP han realizado tareas como el plegamiento de proteínas recién sintetizadas en la célula, la prevención de la agregación de proteínas, la estabilización de proteínas y la eliminación de proteínas mal plegadas. Las HSP se dividen en cinco clases principales según su masa molecular: HSP pequeñas (<40 kDa), HSP60 (60 kDa), Hsp70 (70 kDa), HSP90 (90 kDa) y HSP100 (100 kDa). Cada HSP tiene diferentes isoformas, y se localizan en diferentes partes de la célula. La chaperona molecular Hsp70 juega un papel central en el control de calidad de las proteínas. Al unirse a los sustratos de proteína Hsp70, les ayudan a plegarse, descomponerse, transferirse, regular y prevenir la agrupación. El sustrato de Hsp70 se une a regiones hidrofóbicas en las proteínas y ayuda a las proteínas recién sintetizadas y a las proteínas parcialmente plegadas a plegarse correctamente<sup>(17-21)</sup>.

Estudios previos informaron que el estrés por calor causa bajo rendimiento en el animal y suprime el sistema inmunológico<sup>(22)</sup>. Después del estrés por calor; disminución del peso vivo, palidez en el color de la carne<sup>(23)</sup>, baja inmunidad, bajo equilibrio líquido-electrolítico e irregularidad en el pH sanguíneo<sup>(24)</sup>, incluso se pueden observar casos como muerte súbita en pollos de engorda. Cuando el estrés por calor ocurre en pollos de engorda, se puede producir alteración del equilibrio ácido-base y alcalosis respiratoria<sup>(25)</sup>.

La hesperidina es un antioxidante eficaz que reduce el estrés oxidativo. También inhibe la peroxidación lipídica<sup>(26,27)</sup>. Se ha reportado que la concentración de lactato deshidrogenasa y proteína de choque térmico (Hsp70), que son marcadores de estrés por calor, disminuye con la adición de hesperidina a las raciones de aves de corral<sup>(28)</sup>. Se ha informado que, para superar los efectos negativos del estrés por calor en codornices japonesas, se debe administrar una buena estrategia de nutrición<sup>(29)</sup>. Las dietas suplementadas con hesperidina proporcionan una alternativa al uso de aditivos sintéticos, pueden mejorar el perfil lipídico de la carne de pollo y asegurar una producción de carne de ave de mayor calidad<sup>(30,31)</sup>. Además, estudios recientes han manifestado que el aporte de hesperidina a la ración tiene efectos positivos sobre la calidad de la carne, la calidad del huevo y la microflora intestinal en codornices<sup>(32,33)</sup>.

La industria avícola de los Estados Unidos ha informado que se han perdido \$ 2.4 mil millones debido al estrés por calor<sup>(34)</sup>. Se ha demostrado que el estrés por calor tiene efectos adversos en los pollos de engorda, incluido un mayor consumo de alimento, así como una reducción de la tasa de crecimiento y la vitalidad de los pollos de engorda<sup>(35)</sup>. Además, puede disminuir la calidad de los productos obtenidos de los pollos de engorda al aumentar su grasa abdominal<sup>(36)</sup>. En el presente estudio, se determinarán los efectos de la hesperidina, un subproducto de los cítricos, sobre los parámetros sanguíneos y los niveles de Hsp70.

## Material y métodos

En el estudio, 160 codornices (*Coturnix coturnix japonica*, machos) de 6 semanas de edad con un peso vivo de 150-200 g se alojaron en jaulas durante 1 semana de ejercicio y durante 5 semanas de período experimental con 10 codornices por jaula, un total de 42 días. Las codornices se alojaron en jaulas (45 cm de ancho X 20 cm de alto X 90 cm de largo). El diseño del estudio consta de 4 grupos con 40 animales y 4 subgrupos dentro de cada grupo. La agrupación se realizó en forma de 2x2. Los grupos termoneutrales ( $24 \pm 0.1$  °C) son NC (0 g de hesperidina/kg de alimento base) y NHES3 (3 g de hesperidina/kg de alimento base) y los grupos bajo estrés por calor ( $34 \pm 0.1$  °C) son HC (0 g de hesperidina/kg de alimento base) y HHES3 (3 g de hesperidina/kg de alimento base), y se generaron aleatoriamente. La hesperidina (C28H34O15, núm. de cas: 520-26-13, pureza del 91 %, empresa Chem-Impex International, EE.UU.) utilizada en el estudio estaba disponible comercialmente. Las raciones utilizadas en el experimento se formularon de acuerdo con las recomendaciones del NRC<sup>(37)</sup> (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Composiciones de las dietas utilizadas en el experimento

Ingredientes, %	Dietas****			
	Thermoneutral		Estrés calórico	
	NC	NHES3	HC	HHES3
Trigo	52.03	52.03	52.03	52.03
Maíz	10.42	10.42	10.42	10.42
Aceite vegetal	2.76	2.76	2.76	2.76
Harina de soya, %48	27.52	27.52	27.52	27.52
Piedra caliza*	5.55	5.25	5.55	5.25
Fosfato dicálcico	1.17	1.17	1.17	1.17
Sal	0.26	0.26	0.26	0.26
Vitaminas-minerales, mezcla**	0.25	0.25	0.25	0.25
L treonina	0.03	0.03	0.03	0.03
Hesperidina***	-	0.30	-	0.30
Valores calculados				
Materia seca, %	90.30	90.30	90.30	90.30
Proteína cruda, %	19.96	19.96	19.96	19.96
Cenizas, %	9.80	9.50	9.80	9.50
Celulosa cruda, %	2.86	2.86	2.86	2.86
Estracto etéreo, %	4.56	4.56	4.56	4.56
Energía metabolizable, kcal/kg	2900	2900	2900	2900
Calcio, %	2.50	2.38	2.50	2.38
Fósforo disponible, %	0.35	0.35	0.35	0.35
Metionina +cistina, %	0.64	0.64	0.64	0.64
Lisina, %	1.00	1.00	1.00	1.00
Treonina, %	0.74	0.74	0.74	0.74
Triptófano, %	0.27	0.27	0.27	0.27

\* \*La caliza se redujo y se añadió en lugar de hesperidina en los grupos de experimentación.

\*\*La premezcla de vitaminas y minerales contenía por kg: mg: retinol (vit A) 3, tocoferol (vit E) 30, menadiona (vit K3) 5, tiamina (vit B1) 1, riboflavina (vit B2) 5, piridoxina (vit B6) 3, ácido nicotínico 30, ácido pantoténico 10, ácido fólico 0.8, ácido ascórbico (vit C) 10, cloruro de colina 450, Co 0.2, I 0.5, Se

0.3, Fe 25, Mn 120, Cu 10, Zn 100;  $\mu\text{g}$ : colecalfiferol (vit D3) 62.5, cobalamina (vit B12) 20, biotina 100  $\mu\text{g}$ .

\*\*\*Hesperidina obtenida de la empresa Chem-Impex Int., fórmula molecular (C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub>), núm. de cas (520-26-13), grado de pureza 91 % (Chem-Impex, Wood Dale, IL, EE.UU.)

\*\*\*\*NC= Control (0 g de hesperidina/kg de alimento), ( $24 \pm 0.1$  °C); NHES3= temperatura termoneutral ( $24 \pm 0.1$  °C), (3 g de hesperidina/kg de alimento); HC= temperatura de estrés por calor ( $34 \pm 0.1$  °C); HHES3= temperatura de estrés por calor ( $34 \pm 0.1$  °C), (3 g de hesperidina/kg de alimento).

En el estudio se suministró alimento granular y agua *ad libitum* a los animales. Durante el período de estudio hubo una humedad relativa del 50-60 % en las jaulas. Se utilizaron lámparas fluorescentes para la iluminación, y se utilizó un temporizador (Cata CT 9181, China) durante el ensayo para proporcionar 16 h de luz y 8 h de oscuridad junto con luz solar. Para crear estrés por calor en las jaulas, se utilizaron calentadores eléctricos para calentar los compartimentos. La jaula de ensayo se mantuvo a temperatura ambiente, mientras que el grupo sometido a estrés se mantuvo a  $34 \pm 0.1$  °C durante el período del ensayo utilizando los calentadores eléctricos con control de termostato, y las codornices en el grupo termoneutral se mantuvieron a  $24 \pm 0.1$  °C. Durante el período de experimentación, la humedad relativa de la sala de ensayo se midió constantemente con un higrómetro y se mantuvo bajo control. Se utilizaron ventiladores eléctricos para regular la circulación de aire y deshacerse del polvo acumulado y los gases nocivos en las jaulas.

### Aprobación ética

Este estudio se ha realizado con el permiso de la Universidad Tokat Gaziosmanpaşa, Comité de Ética Local de Experimentos con Animales con fecha 20.05.2021 y con número 51879863-36.

### Análisis bioquímico de gases y suero en sangre

Al final del ensayo, se seleccionaron al azar tres animales de cada subgrupo, lo que equivale a 12 de cada grupo y un total de 48 en general. Se tomaron muestras de sangre de la vena *saphena brachialis* antes del sacrificio, y los valores de gases en sangre se determinaron por método fotométrico utilizando un kit comercial (epoc BGEM blood test, Alemania). Inmediatamente después de que se tomaron las muestras de sangre, se centrifugaron durante 10 min a 3,000 rpm, y luego el suero recogido en la parte superior se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml. Los sueros se congelaron y almacenaron para su análisis en un congelador a -80 °C. Los valores bioquímicos se detectaron en muestras de suero sanguíneo utilizando un dispositivo autoanalizador (Mindray BS200, China).

### Análisis de la expresión del gen Hsp70

Al final del estudio se tomaron muestras de tejido de 2-3 g de hígado, riñón y músculos del pecho de cada animal bajo condiciones higiénicas. A continuación, las muestras de tejido y sangre se almacenaron a -80 °C para el análisis del gen Hsp70. Después de añadir

0.9 ml de solución salina fisiológica a la muestra de tejido de 0.1 g pesada, las muestras de tejido (0.1 g) se homogeneizaron en un buffer de homogeneización [0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1 M]. E-46, 0.08  $\mu$ M de aprotinina, 0,1  $\mu$ M de leupeptina y NP-40 al 0.1 %<sup>(38)</sup> y homogeneizados se centrifugaron a 4 °C durante 20 min a 12,000  $\times$ g utilizando un homogeneizador Ultra-turrax sobre hielo. El sobrenadante se recogió y almacenó a -20 °C hasta la determinación de la proteína. La cantidad de proteína se determinó utilizando ELISA (BT-LAB, E0124Ch). La curva estándar y la detección inmunológica de proteínas se llevaron a cabo mayormente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar y el nivel de significancia se probó con un ANOVA unidireccional. La diferencia entre los grupos se determinó mediante la prueba de comparación múltiple T2 de Bonferroni y Tamhane con un intervalo de significancia de  $P < 0.05$ .

### Resultados

Dentro del alcance del experimento, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos termoneutrales y los grupos bajo estrés por calor en términos de las concentraciones de pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, pH, HCO<sub>3</sub>, Na, K y Cl entre los parámetros sanguíneos ( $P < 0.05$ ); sin embargo, todos los grupos arrojaron los mismos resultados en términos de hematocrito y hemoglobina ( $P > 0.05$ ). En los parámetros de gases en sangre, la pCO<sub>2</sub> fue menor en el grupo bajo estrés por calor HC; fue mayor en el grupo HHES3 ( $P < 0.05$ ). La pO<sub>2</sub> fue mayor en el grupo HC, que es el grupo bajo estrés por calor, y menor en el grupo HHES3 ( $P < 0.05$ ). El pH sanguíneo fue más bajo en el grupo HHES3; fue mayor en el grupo HC ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones sanguíneas de Na y Cl fueron menores en los grupos bajo estrés por calor; fueron mayores en los grupos termoneutrales ( $P < 0.05$ ). La concentración de K fue menor en el grupo HC y fue mayor en el grupo HHES3 ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 2).

Además, la concentración sérica de la enzima fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) en los parámetros séricos sanguíneos fue menor en el grupo HHES3; fue mayor en el grupo HC ( $P < 0.05$ ); no obstante, todos los grupos son similares en términos de otros parámetros (Cuadro 3).

**Cuadro 2:** Efecto de agregar hesperidina a las dietas de codorniz en condiciones termoneutrales y de estrés por calor en los parámetros de gases en sangre

	Termoneutral (24 °C)		Estrés por calor (34 °C)		P
	NC	NHES3	HC	HHES3	
Hgb, g/dl	12.34±0.53	12.40±0.50	10.80±0.07	11.20±0.58	0.06
PCO <sub>2</sub> , mmHg	37.99±0.18 <sup>b</sup>	38.13±0.14 <sup>b</sup>	31.24±0.06 <sup>c</sup>	48.85±2.20 <sup>a</sup>	0.001*
PO <sub>2</sub> , mmHg	46.81±0.69 <sup>c</sup>	50.16±0.50 <sup>ab</sup>	52.36±0.02 <sup>a</sup>	40.09±1.16 <sup>d</sup>	0.001*
Hct, %	36.53±1.62	36.26±1.45	31.81±0.30	32.70±1.66	0.05
pH	7.42±0.01 <sup>b</sup>	7.41±0.001 <sup>b</sup>	7.53±0.01 <sup>a</sup>	7.31±0.02 <sup>c</sup>	0.001*
HCO <sub>3</sub> , mmol/L	23.84±0.01 <sup>b</sup>	24.13±0.06 <sup>b</sup>	25.92±0.44 <sup>a</sup>	24.60±0.03 <sup>b</sup>	0.001*
Na, mmol/L	162.97±0.74 <sup>a</sup>	159.23±0.56 <sup>b</sup>	144.41±0.15 <sup>d</sup>	147.85±0.83 <sup>c</sup>	0.001*
K, mmol/L	4.55±0.09 <sup>b</sup>	4.73±0.05 <sup>b</sup>	3.94±0.01 <sup>c</sup>	5.93±0.17 <sup>a</sup>	0.001*
Cl, mmol/L	129.35±1.33 <sup>a</sup>	118.81±1.79 <sup>b</sup>	109.00±0.001 <sup>c</sup>	108.48±0.14 <sup>c</sup>	0.001*

Hgb= hemoglobina, PCO<sub>2</sub>= presión parcial de dióxido de carbono, PO<sub>2</sub>= presión parcial de oxígeno, Hct= hematocrito, pH= potencial de hidrógeno, HCO<sub>3</sub>= hidrogenocarbonato, Na= sodio, K= potasio, Cl= cloruro.

\*Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales ( $P<0.05$ ).

**Cuadro 3:** Efectos de agregar hesperidina a dietas de codorniz en condiciones termoneutrales y de estrés por calor en los parámetros del suero sanguíneo

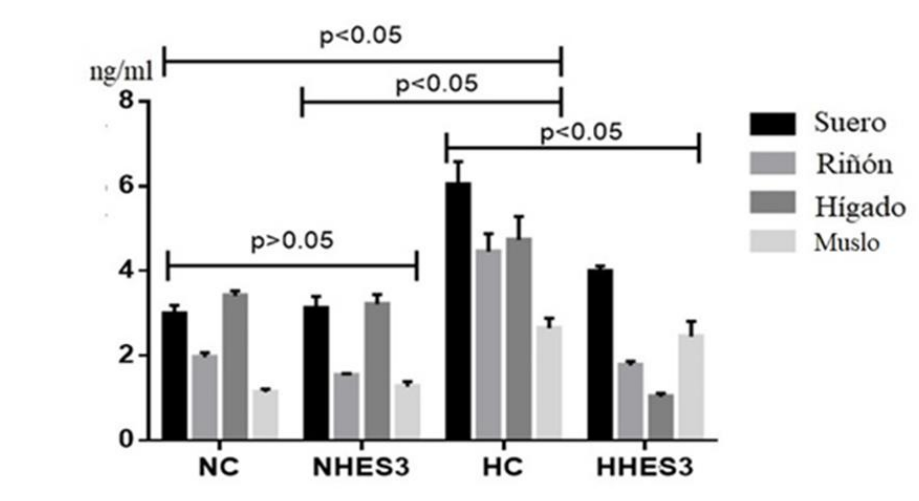
	Termoneutral (24 °C)		Estrés calórico (34 °C)		P
	NC	NHES3	HC	HHES3	
Glucosa, mg/dl	169.62±30.94	144.50±32.89	204.44±35.20	165.39±23.14	0.59
Triglicérido, mg/dl	1156.98±69.06	983.02±176.00	1225.63±3.60	1022.87±141.10	0.48
HDL, mg/dl	59.40±20.54	26.83±13.27	81.90±17.21	43.98±11.74	0.20
Colesterol total, mg/dl	313.03±43.29	262.43±15.81	268.06±18.46	256.43±10.26	0.33
Proteína total, mg/dl	4.52±0.24	4.69±0.27	5.32±0.51	4.72±0.16	0.31
Albumina, g/dl	1.90±0.11	1.87±0.06	1.79±0.06	1.79±0.08	0.69
Globulina, g/dl	3.40±0.41	2.82±0.21	2.94±0.13	2.73±0.16	0.23
ALT, u/l	6.50±0.92	5.67±0.21	8.44±1.09	6.14±1.03	0.17
AST, u/l	194.00±22.52	181.83±10.64	216.33±17.64	199.86±26.28	0.67
ALP, u/l	845.93±161.17 <sup>ab</sup>	622.83±154.07 <sup>b</sup>	1272.91±146.42 <sup>a</sup>	507.16±67.60 <sup>b</sup>	0.001*
Ca, mg/dl	26.21±3.11	22.17±3.18	21.36±1.14	22.40±2.67	0.60
Mg, mg/dl	7.11±0.44	6.91±0.51	6.77±0.27	6.88±0.30	0.94
P, mg/dl	11.60±1.11	12.03±1.46	12.27±0.81	12.68±0.89	0.90

HDL= lipoproteína de alta densidad, ALT= alanina transaminasa: AST= aspartato transaminasa: ALP= fosfatasa alcalina, LDH= lactato deshidrogenasa, Ca= calcio, Mg= magnesio, P= fósforo.

\*Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales ( $P<0.05$ ).

En cuanto al parámetro HSP 70, fue más bajo en el tejido del pecho en los grupos termoneutrales ( $P>0.05$ ). La concentración fue similar en todos los tejidos en los grupos termoneutrales ( $P>0.05$ ). En los grupos bajo estrés por calor, la concentración sérica fue más alta en el grupo HC, pero más baja en el grupo HHES3 ( $P<0.05$ ). La concentración en los tejidos hepáticos y renales fue alta en el grupo HC bajo estrés por calor, mientras que fue significativamente menor en el grupo HHES3. Además, en los grupos bajo estrés por calor, la concentración de Hsp70 en el tejido hepático fue más baja en el grupo HHES3 ( $P<0.05$ ) (Figura 1).

**Figura 1:** Nivel de expresión de proteína de Hsp70 en los grupos experimentales



## Discusión

Existen muchos estudios sobre el efecto del estrés por calor en la adición de vitaminas, aminoácidos y minerales en el alimento de las aves de corral<sup>(3,5)</sup>. El presente estudio se realizó para observar los efectos de la hesperidina, un flavonoide incluido en la dieta, sobre la bioquímica sanguínea y la expresión de Hsp70 en codornices expuestas a estrés por calor.

Dependiendo del aumento de la temperatura ambiental, se producen algunos cambios en la sangre y el metabolismo. En caso de respiración rápida, se produce una alta pérdida de dióxido de carbono, una disminución de la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) en la sangre y un aumento del pH de la sangre. La hiperventilación altera el equilibrio ácido-base en las aves de corral a través del desarrollo de alcalosis respiratoria<sup>(39)</sup>. En el presente estudio la presión  $\text{pCO}_2$  fue menor en el grupo HC, mientras que la presión  $\text{pO}_2$  fue mayor. Mientras que la presión  $\text{pCO}_2$  más alta se observó en el grupo HHES3, la presión  $\text{pO}_2$  fue más baja. Mientras que las presiones  $\text{pCO}_2$  y  $\text{pO}_2$ , que fueron similares en el grupo termoneutral, aumentaron en los grupos bajo estrés por calor, la  $\text{pCO}_2$  aumentó; como era de esperar, la  $\text{pO}_2$  disminuyó. Attia *et al*<sup>(3)</sup> informaron que con la adición de aminoácidos a la ración en pollos de engorda bajo estrés por calor, el pH sanguíneo fue ligeramente mayor en el grupo de control bajo estrés por calor. Dependiendo de la temperatura ambiental, el mayor



pH en el grupo HC y la disminución del pH en el grupo HHES3 pueden estar asociados con la suplementación con hesperidina. En el presente estudio una disminución en el nivel de pH sanguíneo por debajo del nivel de pH neutro (7.35), un aumento en  $p\text{CO}_2$  a 48 mmHg y una disminución en  $p\text{O}_2$  a 40 mmHg en el grupo HHES3 bajo estrés por calor se considera un cuadro de acidosis respiratoria. Además, la concentración de  $\text{HCO}_3$  en sangre es más alta en el grupo HC, mientras que está en el nivel de los grupos termoneutrales en el grupo HHES3. No se ha observado ningún efecto de compensación sobre el pH de la sangre debido a la adición de hesperidina.

Si bien la concentración de hemoglobina en sangre fue más baja en el grupo HC, se acercó a la de los grupos termoneutrales en el grupo HHES3. En estudios previos, también se ha reportado que la concentración de hemoglobina en la sangre que ocurre a temperatura normal tiende a disminuir debido a un aumento del estrés por calor<sup>(40,41)</sup>.

En general, las concentraciones de Na, K y Cl son importantes para el equilibrio ácido-base de la sangre en términos de pH. El pH de la sangre aumenta con la formación de alcalosis respiratoria. En el presente estudio el pH de la sangre fue más alto en el grupo HC de los grupos bajo estrés por calor, como se esperaba, dependiendo del estado de alcalosis. Sin embargo, el pH de la sangre cambió a pH neutro en el grupo HHES3, lo que se pensó que estaba relacionado con el aporte de hesperidina. Contrariamente a los grupos termoneutrales, no se espera que la concentración de Na, que es un catión importante, sea más baja en el grupo HC. Asimismo, la concentración de K en el grupo HC también ha mostrado una disminución. Aunque las concentraciones de Na y K mostraron una similitud general en los grupos normales y de estrés por calor en el presente estudio, se ha observado mayor concentración de K y menor concentración de Cl en sangre en el grupo HHES3 con un pH bajo. Del mismo modo, en un estudio realizado sobre los efectos del estrés por calor en el ganado lechero, se ha informado que una disminución en las concentraciones de Na y K en el líquido ruminal causa excreción urinaria de Na y pérdida de K en la piel<sup>(42)</sup>. El intervalo normal para la concentración de cloro en la sangre está entre 97 y 107 mEq/L. Se ha reportado que, cuando se produce estrés en el cuerpo, los niveles de electrolitos pueden volverse irregulares; por lo tanto, se produce un aumento de la concentración de cloro en la sangre<sup>(43)</sup>. No obstante, en el presente estudio, mientras que la concentración de cloro en la sangre está por encima de los niveles normales en los grupos termoneutrales, se cree que la concentración de cloro en la sangre de un animal bajo estrés por calor ha alcanzado el límite superior como resultado de la compensación.

Se ha informado que la gluconeogénesis se estimula aumentando el número de radicales libres en el ambiente debido al estrés por calor, secretando las hormonas ACTH y cortisol, y evitando la liberación de insulina de las células  $\beta$  en el páncreas; aumentando así los niveles de glucosa sérica<sup>(44)</sup>. Rudich *et al*<sup>(45)</sup> han informado en su estudio que las condiciones de estrés oxidativo afectan negativamente la secreción de insulina. En el presente estudio también se ha determinado que el nivel de glucosa en sangre es más bajo en los grupos termoneutrales que en el grupo HC. Como resultado, al igual que en estudios previos<sup>(46,47)</sup>, la concentración de glucosa en sangre aumentó en el grupo HC bajo estrés

por calor; y hesperidina en el grupo NHES3 y la concentración más baja en el grupo HHES3 bajo estrés por calor en comparación con el grupo HC. Se ha reportado que el estrés causado por la administración de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), una de las hormonas del estrés, aumenta los niveles de glucosa, colesterol y lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) en sangre, pero reduce el nivel de triglicéridos<sup>(48)</sup>. Moeni *et al*<sup>(49)</sup> reportaron que el aporte de cromo a las raciones de pollos de engorda reduce los niveles de triglicéridos, colesterol y LDL en sangre, pero aumenta las concentraciones de colesterol y HDL.

Como se informa en estudios previos, se observó que la concentración de triglicéridos en sangre fue más alta en el grupo HC bajo estrés por calor y cercana en el grupo HHES3, mientras que fue cercana en el grupo NHES3. Eso significa que la concentración de triglicéridos en la sangre ha aumentado debido al estrés por calor. Según Rashidi *et al*<sup>(47)</sup>, ese aumento en el nivel de lípidos en la sangre se debe al estrés por calor, a la disminución del consumo de alimento y a la provisión de necesidades energéticas por movilización de recursos lipídicos. Por otro lado, en el presente estudio, informaron que la adición de cromo y selenio orgánico a la ración disminuyó el contenido de lípidos séricos, similar a la disminución en los niveles séricos de colesterol total y triglicéridos en los grupos NHES3 y HHES3 en comparación con el grupo HC. Se observó que la concentración de HDL en sangre en los grupos termoneutrales fue menor en los grupos NHES3 y HHES3 en comparación con el grupo NC bajo estrés por calor, en comparación con el grupo HC. Como resultado, se cree que la proporción de HDL disminuyó con la adición de hesperidina.

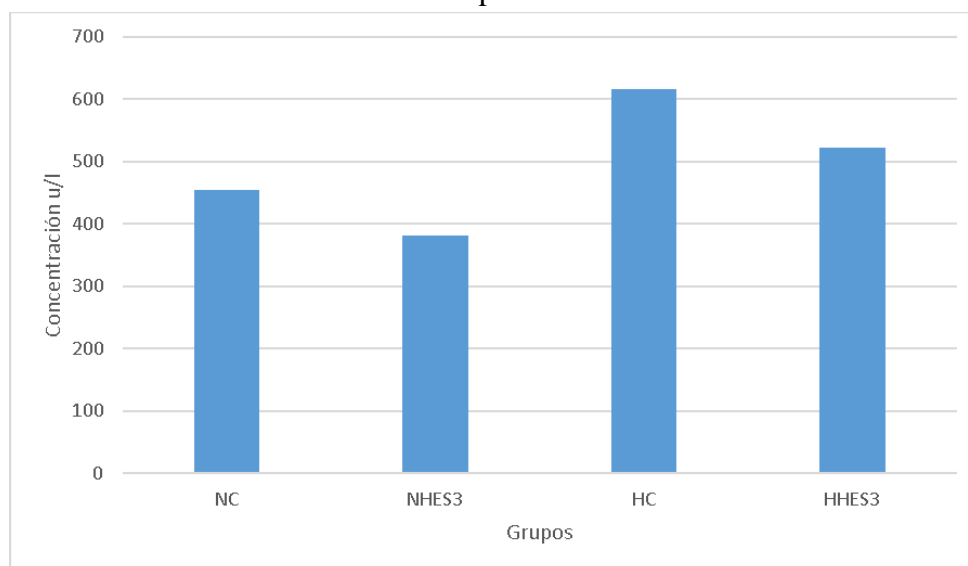
Además, en respaldo del presente trabajo, Moeini *et al*<sup>(49)</sup> informaron que, cuando el estrés fue creado por estrés por calor ( $33 \pm 3$  °C), el nivel de colesterol total disminuyó en los grupos de ensayo donde se añadió cromo orgánico en comparación con el grupo de control, dependiendo del aumento de la dosis. Del mismo modo, en el presente estudio, la concentración de colesterol total en el grupo NHES3 disminuyó sin dependencia del estrés por calor. El grupo con la hesperidina adicional, que está bajo estrés por calor, tiene el nivel más bajo de colesterol. Se cree que la disminución de la concentración de colesterol total en el grupo HHES3 en comparación con el grupo de control normal y el grupo de control bajo estrés por calor ocurrió debido a la adición de hesperidina de 3 g/kg y la dosis.

El estrés oxidativo causado por el estrés por calor aumenta la producción de radicales libres, lo que conduce a la oxidación de la membrana celular, la peroxidación lipídica que conduce al daño hepatocelular, el aumento de los niveles de enzimas intracelulares, que incluyen la aspartato aminotransferasa (AST) y la lactato deshidrogenasa (LDH). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos normales y de estrés por calor en términos de los niveles de enzimas ALP en suero sanguíneo ( $P < 0.05$ ). En el presente estudio, la concentración sérica sanguínea de la enzima fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) en el grupo HC bajo estrés por calor aumentó debido al estrés por calor. Sin embargo, una disminución significativa observada tanto en el grupo NHES3

en los grupos termoneutrales como en el grupo HHES3, que es el grupo bajo estrés por calor, puede deberse a la suplementación con hesperidina. En general, se ha observado que las concentraciones de las enzimas ALT, AST, ALP y LDH cambian tanto en los grupos termoneutrales como en los de estrés por calor debido al aporte de hesperidina. Mehaisen *et al*<sup>(50)</sup> observaron un aumento similar en la concentración de enzimas ALT, AST en el grupo de control bajo estrés por calor debido a la adición de propóleo a la ración en estrés por calor. En el mismo estudio, se informó que los niveles de las enzimas ALT y AST disminuyeron con la adición de propóleo en los grupos de ensayo de manera similar a como lo hicieron en el presente estudio. Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con estudios previos<sup>(51,52)</sup>. En el presente estudio se ha observado que el nivel de AST es ligeramente más alto en los grupos termoneutrales que en los grupos bajo estrés por calor. No obstante, los datos de AST obtenidos en el estudio de estrés por calor realizado por Abdelhady *et al*<sup>(53)</sup> han reportado una concentración menor que el presente estudio.

En la Figura 2 se observó que el nivel enzimático de LDH fue menor en los grupos bajo estrés por calor en comparación con los grupos termoneutrales, pero tanto los grupos NHES3 y HHES3 fueron menores que los grupos NC y HC. De manera similar al presente estudio, Al-Mashhadini *et al*<sup>(54)</sup> han informado que el uso de aceite de sésamo en animales expuestos a estrés por calor ha reducido la concentración de enzimas LDH en sangre en el grupo alimentado con aceite de sésamo adicional en comparación con el grupo de control a temperatura normal, que la concentración de la enzima LDH aumentó debido al efecto del estrés en el grupo de control bajo estrés por calor, y que se encontró que la concentración de enzimas LDH era menor en el grupo alimentado con aceite de sésamo adicional que en el grupo de testigo. Además, existen múltiples estudios que reportan que la concentración de LDH en sangre aumenta debido al estrés por calor en aves de corral expuestas a 41-42 °C de temperatura<sup>(55,56)</sup>.

**Figura 2:** Nivel de la enzima lactato deshidrogenasa en condiciones termoneutrales y de estrés por calor



En el presente estudio se ha observado que los niveles de proteína total tienen una concentración un poco más alta en condiciones termoneutrales que en estrés por calor (Cuadro 3). La adición de hesperidina a la ración en el grupo HHES3 aumentó el nivel de proteína. El nivel de proteína total aumentó en los grupos HC bajo estrés por calor, pero se ha observado una disminución en el grupo HHES3 con la hesperidina adicional. Un alto nivel de proteína total bajo estrés por calor se asocia con un aumento en la concentración de proteínas de choque térmico (Hsp70)<sup>(57,58)</sup>.

La concentración de albúmina en el suero sanguíneo estuvo en una concentración similar en los grupos termoneutrales que en los grupos bajo estrés por calor. Como resultado, a excepción de una ligera disminución en el nivel de albúmina de la condición termoneutral al estrés por calor, se cree que la adición de hesperidina no tiene un efecto positivo sobre la concentración de albúmina en la sangre. Efecto de la vitamina E sobre el estrés por calor, Şahin<sup>(59)</sup> ha informado que el estrés por calor inhibió el total, existiendo una situación similar en términos de globulina. Se encontró un nivel más bajo de globulina bajo estrés por calor que a temperatura normal. Similar al presente estudio, en un trabajo que investigó la concentración de proteína y albúmina.

Entre los estudios recientes sobre el estrés por calor, Al-Mashhadani *et al*<sup>(54)</sup> determinaron el efecto del aceite de sésamo sobre el estrés por calor y encontraron que la concentración de albúmina en la sangre aumentó hacia el grupo bajo estrés por calor; sin embargo, el grupo con estrés por calor y aceite de sésamo ha presentado una disminución, como en el presente estudio. Conocida como chaperona molecular, Hsp70 es una proteína que se ha conservado a lo largo de la evolución y es producida por las células de todos los seres vivos en respuesta a estímulos de estrés. Los niveles de Hsp70 son bastante altos en los primeros momentos en que comienza el estrés celular. Hsp70 es vital en todas las etapas del metabolismo celular, incluyendo el crecimiento, diferenciación, división e incluso muerte celular. En particular, el estrés por calor y la cantidad de ERO que aumenta en consecuencia interrumpen las estructuras tridimensionales y la estabilidad de las proteínas en las células, lo que lleva a su desnaturalización. Los factores de estrés celular en el citosol complican el proceso de plegamiento de las proteínas. Por lo tanto, el control de calidad de las proteínas es necesario para que la célula mantenga su viabilidad. Hsp70 tiene funciones tales como el plegamiento correcto de cadenas de proteínas recién sintetizadas, translocación de proteínas entre membranas, inhibición de la agregación de proteínas y la detección de proteínas deterioradas para su degradación. Así, Hsp70 ha sido reconocido como un biomarcador importante para aumentar los niveles de expresión de Hsp70 para mantener la integridad celular en casos de aumento del estrés en la célula y para monitorear el estrés por calor y ERO que aumentan en consecuencia<sup>(17-19)</sup>. En estudios previos, se ha informado que la quercetina y varios otros flavonoides inhiben la inducción de Hsp70 causada por el choque térmico a nivel celular a nivel de acumulación de ARNm<sup>(60)</sup>. Budagova *et al*<sup>(61)</sup> reportaron que la quercetina, uno de los flavonoides naturales de la respuesta celular *in vitro* al estrés inducido por el estrés por calor, inhibe completamente la síntesis y acumulación intracelular de proteína de choque térmico (Hsp70) en respuesta a la hipertermia. Kim *et al*<sup>(62)</sup> han reportado en su estudio que la

fisetina, un flavonoide dietético, puede inhibir la actividad de HSP, interactuar con la proliferación de células cancerosas e inducir la apoptosis. Xu *et al*<sup>(63)</sup> han informado en su estudio que la quercetina puede tener un papel citoprotector que puede actuar a través de una vía mitocondrial durante la exposición al estrés por calor. En el presente estudio hubo una disminución en los niveles de Hsp70 en el suero sanguíneo y tejidos renales, hepáticos y del pecho de codorniz, en el grupo HHES3 en comparación con el grupo HC en los grupos bajo estrés por calor. Sin embargo, el nivel de Hsp70 en los tejidos hepáticos, renales y del pecho en los grupos termoneutrales fue similar al del grupo NC. De acuerdo con estos resultados, se cree que la suplementación con hesperidina en casos de estrés por calor tiene un gran potencial como un aporte importante para reducir el aumento del estrés en los tejidos debido al aumento del calor, similar a estudios anteriores.

## Conclusiones e implicaciones

Como resultado, la prevención y el tratamiento de enfermedades utilizando fitoquímicos, en particular flavonoides, son bien conocidos. Las frutas y verduras son fuentes naturales de flavonoides. Varios flavonoides que se encuentran en la naturaleza tienen sus propias propiedades físicas, químicas y fisiológicas. Estas sustancias se utilizan más ampliamente en los países en desarrollo. Como resultado del estudio, cuando la hesperidina, un flavonoide, se agregó al alimento, en comparación con el grupo HC, en el grupo HHES3 causó una mejora en las concentraciones de hemoglobina, pO<sub>2</sub>, pH, HCO<sub>3</sub> y Cl en el caso de estrés por calor. Además, en el caso de estrés por calor, las concentraciones de glucosa, triglicéridos, HDL y colesterol total en sangre disminuyeron en el grupo HHES3 en comparación con el grupo HC. La concentración de enzimas ALP mostró una disminución significativa en el grupo HHES3 en comparación con el grupo HC bajo la condición de estrés por calor. El nivel de proteína Hsp70 aumentó en el suero sanguíneo y tejidos de riñón, hígado y del pecho en el grupo HC con estrés celular durante el estrés por calor; no obstante, la concentración de Hsp70 disminuyó significativamente en el grupo HHES3. Se cree que el uso de hesperidina, que es un suplemento agregado al alimento bajo estrés por calor, puede ofrecer una estrategia nutricional potencial para superar los efectos nocivos de los factores estresantes en la avicultura.

## Agradecimientos y conflicto de interés

Este estudio no recibió financiamiento. Los autores no tienen intereses financieros o no financieros relevantes que revelar. Todos los autores contribuyeron a la concepción y diseño del estudio. La preparación del material, la recopilación de datos y el análisis fueron realizados por [Abdullah Özbilgin], [Onur Başbuğ] y [Aykut Özgür]. El primer borrador del manuscrito fue escrito por [Abdullah Özbilgin] y todos los autores comentaron versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

**Literatura citada:**

1. Bartlett JR, Smith MO. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poult Sci* 2003;82:1580–1588.
2. Attia YA, Bohmer BM, Roth-Maier DA. Responses of broiler chicks raised under constant relatively high ambient temperature to enzymes, amino acid supplementations, or a high-nutrient diet. *Arch fur Geflugelkunde* 2006;70:80-91.
3. Attia YA, Hassan RA, Tag El Din AE, Abou Shehema BM. Effect of ascorbic acid or increasing metabolizable energy level with or without supplementation of some essential amino acids on productive and physiological traits of slow growing chicks exposed to chronic heat stress. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011;95:744-755.
4. Attia YA, Hassan SS. Broiler tolerance to heat stress at various dietary protein/energy levels. *Eur Poult Sci* 2017;81. DOI: 10.1399/eps.2017.171
5. Şahin K, Sahin N, Önderci M, Yaralioglu S, Küçük O. Protective role of supplemental vitamin E on lipid peroxidation, vitamins E, A and some mineral concentrations of broilers reared under heat stress. *Vet Med* 2001;46:140-144.
6. Attia YA, Abd El Hamid AEE, Abedalla AA, Berika MA, Al Harthi MA, Kucuk O, Abou Shehema BM. Laying performance, digestibility and plasma hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin C, and/or vitamin E supplementation. *Springerplus* 2016;5(1):1619.
7. Pardue SL, Thaxton JP, Brake J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J Appl Physiol* 1985;58:1511-1516.
8. Siegel HS. Adrenals, stress and the environment. *Worlds Poult Sci J* 1971;27:327-349.
9. Siegel HS, Van Kampen M. Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. *Br Poult Sci* 1984;25:477-485.
10. Ahmad T, Mushtaq T, Khan MA, Babar ME, Yousaf M, Hasan ZU, Kamran Z. Influence of varying dietary electrolyte balance on broiler performance under tropical summer conditions. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2009;93:613-621.
11. Borges SA, Fischer DA, Silva AV, Majorca A, Hooge DM, Cummings KR. Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram). *Poult Sci* 2004;83:1551-1558.
12. Olanrewaju HA, Purswell JL, Collier SD, Branton SL. Physiology, endocrinology, and reproduction. Effect of ambient temperature and light intensity on physiological reactions of heavy broiler chickens. *Poult Sci* 2010;89:2668-2677.

13. Pawar SS, Basavaraj S, Dhansing LV, Nitin KP, Sahebrao KA, Vitthal NA, Manoj BP, Kumar BS. Assessing and mitigating the impact of heat stress in poultry. *Adv Anim Vet* 2016;4:332–341.
14. John M. Functional morphology of the avian respiratory system, the lung-air sac system: efficiency built on complexity. *Ostrich* 2009;79:117–132.
15. Bongiovanni GA, Soria EA, Eynard AR. Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food Chem Toxicol* 2007;45:971–976.
16. Akbarian A, Michiels J, Golian A, Buyse J, Wang Y, De Smet S. Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. *Poult Sci* 2014;93:1930–1941.
17. Özgür A, Tutar Y. Heat shock protein 90 inhibition in cancer drug discovery: from chemistry to future clinical applications. *Anticancer Agents Med Chem* 2016;16(3):280-290.
18. Tutar L, Tutar Y. Heat shock proteins; An overview. *Curr Pharm Biotechnol* 2010;11(2):216-222.
19. Tutar Y. Hsp70 in oncology. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2011;5(3):214-218.
20. Li J, Fu X, Cao S, Li J, Xing S, Li D, Dong Y, *et al.* Membrane-associated androgen receptor (AR) potentiates its transcriptional activities by activating heat shock protein 27 (HSP27). *J Biol Chem* 2018;293:12719–12729.
21. Slimen IB, Najjar T, Ghram A, Dabbebi H, Mrad MB, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia* 2014;30(7):513-523.
22. Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Sakai M, Sa LR, Ferreira AJ, Palermo-Neto J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poult Sci* 2010;89:1905-1914.
23. Tankson HD, Vizzier-Thaxton Y, Thaxton J, May J, Cameron J. Stress and nutritional quality of broilers. *Poult Sci* 2001;80:1384–1389.
24. Ahmad T, Khalid T, Mushtaq T, Mirza MA, Nadeem A, Babar ME, Ahmad G. Effect of potassium chloride supplementation in drinking water on broiler performance under heat stress conditions. *Poult Sci* 2008;87:1276-1280.
25. Syafwan S, Kwakkel RP, Verstegen MWA. Heat stress and feeding strategies in meat type chickens. *Worlds Poult Sci J* 2011;67:653-674.

26. Jain DP, Somani RS. Antioxidant potential of hesperidin protects gentamicin induced nephrotoxicity in experimental rats. *Austin J Pharmacol Ther* 2015;3:1071.
27. El-Shafey MM, Abd-Ellah GM. Hesperidin improves lipid profile and attenuates oxidative stress in hypercholesterolemic rats. *Int J Pharm Sci* 2014;4:554-559.
28. Kamboh AA, Hang SQ, Bakhsetgul M, Zhu WY. Effects of genistein and hesperidin on biomarkers of heat stress in broilers under persistent summer stress. *Poult Sci* 2013;92:2411-2418.
29. Önderci M, Sahin K, Sahin N, Gürsu MF, Doerge D, Sarkar FH, Küçük O. The effect of genistein supplementation on performance and antioxidant status of Japanese quail under heat stress. *Arch Anim Nutr* 2004;58:463-471.
30. Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res* 2010;61:219-225.
31. Kamboh AA, Zhu WY. Effect of increasing levels of bioflavonoids in broiler feed on plasma anti-oxidative potential, lipid metabolites, and fatty acid composition of meat. *Poult Sci* 2013;92:454-461.
32. Özbilgin A, Kara K, Gümüş R, Tekçe E. Fatty acid compositions and quality of egg and performance in laying quails fed diet with hesperidin. *Trop Anim Health Prod* 2021;53:518.
33. Özbilgin A, Kara K, Urcar GS. Effect of hesperidin addition to quail diets on fattening performance and quality parameters, microbial load, lipid peroxidation and fatty acid profile of meat. *J Anim Feed Sci* 2021. <https://doi.org/10.22358/jafs/143104/2021>.
34. Özbilgin A, Moulko MN, Bayomendur FE, Ercan N. Effect of hesperidin supplementation on blood profile, antioxidant capacity, intestinal histomorphology and fecal microbial counts in Japanese quails. *Rev Mex Cienc Pecu* 2023;14(3):505-522.
35. Teeter RG, Belay T. Broiler management during acute heat stress, *Anim Feed Sci Technol* 1996;58:127–142.
36. N'dri AL, Mignon-Grasteau S, Sellier N, Beaumont C, Tixier-Boichard M. Interactions between the naked neck gene, sex, and fluctuating ambient temperature on heat tolerance, growth, body composition, meat quality, and sensory analysis of slow growing meat-type broilers. *Livest Sci* 2007;110:33–45.
37. NRC. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. National Academy Press. Washington, DC. USA. 1994.



38. Shaila S, Angshuman S, Abhijeet K, Samindranath M, Pal JK. Flufenoxuron, an acylurea insect growth regulator, alters development of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) by modulating levels of chitin, soluble protein content, and Hsp70 and p34cdc2 in the larval tissues. *Pestic Biochem Physiol* 2006;85(2):84-90.
39. Calder WA, Schmidt-Neilsen K. Temperature regulation and evaporation in the pigeon and road runner. *Am J Physiol* 1967;213:883–889.
40. Magda AAG. Some managerial and environmental conditions affecting on productive and physiological characters in quail. [PhD thesis]. Department of Animal Production, Cairo University. 1999.
41. Mahmoud UT, Abdel-Rahman M, Darwish MHA, Mosaad GM. The effect of heat stress on blood picture of Japanese quail. *J Adv Vet Anim Res* 2013;3:69-76.
42. Özhan M, Tüzemen N, Yanar M. Büyükbaş hayvan yetiştirme. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Erzurum No:134. 2001;604.
43. Haddadin MSY, Abdulrahim MS, Hashlamoun EAR, Robinson KR. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poult Sci* 1996;75:491-494.
44. Ajakaiye JJ, Perez-Bello A, Mollineda-Trujillo A. Impact of vitamins C and E dietary supplementation on leukocyte profile of layer hens exposed to high ambient temperature and humidity. *Acta Vet Brno* 2010;79:377-383.
45. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1998;47:1562-1569.
46. Kutlu HR, Forbes JM. Changes in growth and blood parameters in heat-stressed broiler chicks in response to dietary ascorbic acid. *Livest Prod Sci* 1993;36:335-350.
47. Rashidi AA, Ivary YG, Khatibjoo A, Vakilia R. Effects of dietary fat, vitamin E and zinc on immune response and blood parameters of broiler reared under heat stress. *Res J Poult Sci* 2010;3(2):32-38.
48. Mumma JO, Thaxton JP, Vizzier-Thaxton Y, Dodson WL. Physiological stress in laying hens. *Poult Sci* 2006;85:761–769.
49. Moeini MM, Bahrami A, Ghazi S, Targhibi MR. The effect of different levels of organic and inorganic chromium supplementation on production performance, carcass traits and some blood parameters of broiler chicken under heat stress condition. *Biol Trace Elem Res* 2011;144:715-724.

50. Mehaisen GMK, Desoky AA, Sakr OG, Sallam W, Abbas AO. Propolis alleviates the negative effects of heat stress on egg production, egg quality, physiological and immunological aspects of laying Japanese quail. *PloS one* 2019;14(4):e0214839.
51. Mujahid A, Akiba Y, Toyomizu M. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young White Leghorn cockerels by down regulation of avian uncoupling protein. *Poult Sci* 2007;86:364-371.
52. Tan GY, Yang L, Fu YQ, Feng JH, Zhang MH. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. *Poult Sci* 2010;89:115-122.
53. Abdelhady DH, Elabasy MA, Atta MS, Ghazy EW, Abuzed TK, El-Moslumany A. Synergistic ameliorative effects of organic chromium and selenium against heat stress in japanese quails: performance, immunological, hematological, Biocheml Antioxidant Studies. *AJVS* 2017;55(2):113-123.
54. Al-Mashhadini T, Al-Hayali HL. Biochemical and physiological study of the effect of sesame seeds on quail males exposed to thermal stress. *Indian J Public Health Res Dev* 2020;11(4):1077-1083.
55. Al-Zeer AH, El-Hazmi MA, Wars AS, Ansari ZA, Yrkendi MS. Serum enzymes in heat stroke: prognostic implication. *Clin Chem* 1997;43(7):1182-1187.
56. Melesse A, Maak S, Schmidt R, von Lengerken G. Effect of long-term heat stress on key enzyme activities and T3 levels in commercial layer hens. *Int J Livest Prod* 2011;2(7):107-116.
57. Jaiswal SK, Raza M, Uniyal S, Chaturvedani AK, Sahu V, Dilliwar L. Heat stress and its relation with expression of heat shock proteins in poultry. *Int J Environ Sci Technol (Tehran)* 2017;6(1):159-166.
58. Erişir Z, Simsek UG, Özçelik M, Baykalır Y, Mutlu SI, Çiftci M. Effects of dietary grape seed on performance and some metabolic assessments in Japanese quail with different plumage colors exposed to heat stress. *Rev Bras Zootec* 2018;47:e20170172.
59. Şahin K. Optimal dietary concentration of vitamin E for alleviating the effect of heat stress on performance, thyroid status, ACTH and some serum metabolite and mineral concentrations in broilers. *Czech J Anim Sci* 2002;47(4):110-116.
60. Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M, *et al.* Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct* 1990;15(6):393-401.
61. Budagova KR, Zhmaeva SV, Grigorev AN, Goncharova AY, Kabakov AE. Flavonoid dihydroquercetin, unlike quercetin, fails to inhibit expression of heat shock proteins under conditions of cellular stress. *Biochem* 2003;68:1055–1061.

62. Kim JA, Lee S, Kim DE, Kim M, Kwon BM, Han DC. Fisetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis of cancer cells by inhibiting HSF1 activity through blocking its binding to the hsp70 promoter. *Carcinogenesis* 2015;36(6):696-706.
63. Xu J, Tang S, Song E, Yin B, Bao E. Inhibition of heat shock protein 70 intensifies heat-stressed damage and apoptosis of chicken primary myocardial cells *in vitro*. *Mol Med Rep* 2017;15(5).