

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
DUODENO E RIM DE GALINHAS POEDEIRAS
SUBMETIDAS A DIETAS COM DIFERENTES
NÍVEIS DE CÁLCIO E FÓSFORO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LETÍCIA ALVES SALMÓRIA

**GUARAPUAVA-PR
2022**

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

S171a Salmória, Leticia Alves
Análise de expressão gênica de duodeno e rim de galinhas poedeiras submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio e fósforo / Leticia Alves Salmória. – – Guarapuava, 2022.
xii, 118 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Área de concentração: Saúde e Produção Animal Sustentável, 2022.

Orientadora: Adriana Mércia Guaratini Ibell
Coorientador: Fernando de Castro Tavernari
Banca Examinadora: Jane de Oliveira Peixoto, Mônica Corrêa Ledur

Bibliografia

1. Transcriptoma. 2. qPCR. 3. Galinhas. 4. Nutrigênica. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636

LETÍCIA ALVES SALMÓRIA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE DUODENO E RIM DE GALINHAS
POEDEIRAS SUBMETIDAS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE
CÁLCIO E FÓSFORO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Adriana Mércia Guaratini Ibell

Prof^o. Dr. Fernando de Castro Tavernari

**GUARAPUAVA-PR
2022**

LETÍCIA ALVES SALMÓRIA**EXPRESSÃO GÊNICA EM DUODENO E RIM DE GALINHAS POEDEIRAS
SUBMETIDAS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE CÁLCIO E
FÓSFORO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2022.

Prof^ª Dr.^ª Adriana Mércia Guaratini Ibelli – EMBRAPA -SC



Presidente

Prof^ª. Dr^ª. Jane de Oliveira Peixoto – EMBRAPA -SC



Membro


Prof^ª. Dr^ª. Mônica Corrêa Ledur – EMBRAPA -SC



Membro

GUARAPUAVA-PR

2022

	Certificado*	ETICA 1/1
---	--------------	--------------

*Em concordância com a Orientação Técnica CONCEA no 8, de 18 de março de 2016 (Anexo I)

Certificamos que a proposta intitulada "Otimização no uso de cálcio, fósforo e vitamina D na nutrição de poedeiras", registrada com o nº 017/2016, sob a responsabilidade de **Fernando Tavernari** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 8.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Embrapa Suínos e Aves, em reunião de 09/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/08/2017 – 31/07/2021
Espécie/linhagem/raça	Gallus gallus/ Poedeiras
Nº de animais	2800
Peso/Idade	1250g/18 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Incubatório comercial



Presidente CEUA/CNPSA

Dedico aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Sempre será por Ele... Obrigada pela tua presença em todos os momentos!

Aos meus pais pelo incentivo e apoio em todas as situações!

Aos meus verdadeiros amigos, por acompanharem esta etapa e por estarem sempre ao meu lado!

Chaiane, Jéssica, Jhulia e Silmar!

Aos amigos que vida me deu durante o tempo que estive em Concórdia!

Karine, Mari, Débora, Ágata, Fran, Suelen e Alexandre!

Ao pessoal do Laboratório de Genética da Embrapa Suínos e Aves, por todo conhecimento passado!

Em especial a minha orientadora Adriana, pela paciência, atenção, incentivo e ajuda... Muito Obrigada!!!

Em todas as coisas, o sucesso depende da preparação prévia.

(Confúcio)

RESUMO

Letícia Alves Slmória. Análise de expressão gênica de duodeno e rim de galinhas poedeiras submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio e fósforo 2022. Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Guarapuava - PR.

Os minerais cálcio (Ca) e fósforo (P) são essenciais na dieta de poedeiras, participam de muitas funções metabólicas, além da formação da casca do ovo. Porém, níveis inadequados podem resultar em perdas econômicas significativas após o pico de postura, pela redução da capacidade de absorção mineral. Portanto, o objetivo do trabalho foi analisar o perfil de expressão de genes relacionados com Ca e P, utilizando duodeno e rim de poedeiras com idade avançada. As amostras foram coletadas de poedeiras Bovans White, com 73 semanas, provenientes de três grupos com diferentes níveis de desempenho e relação Ca/P na dieta, sendo: (HP) alto desempenho (22,43 Ca/P), baixo desempenho (HL) 6,71% Ca/P e dieta padrão (SDT) comumente utilizada 11,43 Ca/P. Para o estudo, foi realizado o sequenciamento do mRNA, com 27 amostras do duodeno (9/grupo), utilizando a técnica de RNA-Seq. Para análise de expressão gênica do rim, 30 amostras (10/grupo) foram submetidas a avaliação de oito genes candidatos escolhidos, sendo eles: *CYP24A1*, *FG3R*, *PTH*, *TRPV6*, *CALB1*, *CALM2*, *FGF1* E *TRPC3*. Como resultado, considerando as comparações entre os grupos, 107 genes foram diferencialmente expressos (DE, FDR <0.05) no duodeno. Muitos genes foram enriquecidos em processos de homeostasia mineral, destacando-se os genes: *CAV1*, *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI*, *TNIP3*, *COL3A1*, *PKIA*, *FGF7*, *ESRRG*, *PTH LH*, *ADIPOQ* e *ESRRG*. No rim, os genes *CYP24A1* e *TRCP3* foram DE entre os grupos HP e STD e entre LP e STD, respectivamente. Neste estudo, identificamos novos genes candidatos aos mecanismos de cálcio e fósforo em poedeiras com idade avançada.

Palavras-Chave: transcriptoma; qPCR; poedeiras; nutrigênômica.

ABSTRACT

Letícia Alves Salmória

Analysis of gene expression of duodenum and kidney of laying hens diets with different levels of calcium and phosphorus

The minerals calcium (Ca) and phosphorus (P) are essential in the diet of laying hens, participating in many metabolic functions, in addition to eggshell formation. However, the different levels can result in a big difference, due to the reduction of the mineral's absorption capacity. Therefore, the objective of this work was to profile the expression of Ca and P-related genes, using duodenum and kidney of older laying hens. Samples were collected from Bovans White laying hens, aged 73 weeks, from three groups with different levels of performance and Ca/P ratio in the diet, as follows: (HP) high performance (22.43 Ca/P), low performance (HL) 6.71% Ca/P and the standard diet (STD) commonly used 11.43 Ca/P. For the study, RNA sequencing was performed with 27 samples from the duodenum (9/group), using the RNA-Seq technique. For kidney expression, 30 kidney samples (10/group) were selected, evaluation analysis of the chosen genes, being: *CYP24A1*, *FG3R*, *PTH*, *TRPV6*, *CALB1*, *CALM2*, *FGF1* and *TRPC3*. As a result, considering the comparisons between groups, 107 genes were enriched in mineral homeostasis processes, highlighting the genes: *CAV1*, *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI*, *TNIP3*, *COL3A1*, *PKIA*, *FGF7*, *ESRRG*, *PTH1H*, *ADIPOQ* e *ESRRG*. No difference, as genes *CYP24A1* and *TRPC3* genes were DE between HP and STD groups and between hp and std, respectively. In this study, we identified new candidate genes for calcium and phosphorus mechanisms in older laying hens.

Palavras chaves: transcriptome; qPCR; laying hens; nutrigenomics.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Table 1. Different levels of calcium and phosphorus provided for the laying hens.	54
Table 2. Primers for the reference candidate genes evaluated in kidneys of laying hens.	57
Table 3. Primers for the target genes evaluated in kidneys of laying hens.	59
Table 4. Means and standard errors of phenotypic traits evaluated in tibia and humerus bones from laying hens.	62

CAPITULO II

Tabela 1. Diferentes relações de Cálcio e Fósforo fornecidas na dieta de poedeiras Bovans White.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2. Número de leituras por amostra antes e após a análise de controle de qualidade.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3. Processos biológicos encontrados no PANTHER database, referentes aos genes DE, expressos nas amostras de duodeno, entre o grupo de melhor desempenho e o grupo controle.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4. Processos e seus respectivos genes enriquecidos, encontrados através do MSigDB.	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE FIGURAS REFEERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Evolução da produção de ovos no Brasil em 30 anos, produção de ovos (mil dúzias). Fonte: Silva, 2019.....	18
Figura 2. Esquema dos mecanismos fisiológicos que ocorrem na regulação de cálcio em poedeiras.	23

CAPITULO I

Figure 1. Histopathological slide stained with hematoxylin and eosin (HE).	61
Figure 2. Relative expression performed in kidney of 73-week-old laying hens. *p<0.05.....	63

CAPITULO II

Figura 1. Amostras do duodeno coradas com eosina e hematoxilina.	94
Figura 2. Gráfico de Escala multidimensional (MDS) com as amostras do grupo com a dieta padrão (STD) em vermelho, grupo de alto desempenho (HP) em verde e grupo de baixo desempenho (LP) em azul.....	96
Figura 3. Representação dos grupos de melhor desempenho e dieta padrão, com dois genes DE, (FDR < 0,05) com regulação negativa e positiva.....	97
Figura 4. Representação dos grupos de HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P). Genes diferencialmente expressos (FDR < 0,05). Eixo x representa a média dos valores de expressão, e o eixo y são os valores de Log2FC.....	98
Figura 5. Rede de interação gênica realizado através da base de dados STRING, com os 105 genes DE no duodeno, na comparação entre HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P).	101

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ca	Cálcio
DEPC	dietil pirocarbonato
DE	diferencialmente expressos
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosforados
GWAS	associação genômica ampla
Log CPM	contagem por milhão
Mg	miligramas
Mm	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
Nm	Nanômetros
OD	densidade óptica
P	Fósforo
PCR	reação em cadeia de polimerase
Pd	fósforo disponível
qPCR	PCR quantitativa
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
RIN	<i>integrity number</i>
RNA	ácido ribonucleico

RNA	Ribossomal
RNA-Seq	sequenciamento de RNA
tRNA	RNA transportador
RPKM	<i>Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped sequence reads</i>
RT –qPCR	transcrição reversa
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
Tm	temperatura de <i>Melting</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 AVICULTURA DE POSTURA NO BRASIL	18
3.2 MELHORAMENTO GENÉTICO NA AVICULTURA DE POSTURA	19
3.3 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS CA E P NA AVICULTURA DE POSTURA.....	21
3.5 FISIOLOGIA METABÓLICA DO CÁLCIO	22
3.6 FISIOLOGIA METABÓLICA DO FÓSFORO.....	24
3.7 FORMAÇÃO DA CASCA DO OVO	26
3.8 ESTUDOS DE CA E P NA NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS.....	27
3.9 NUTRIGENÔMICA.....	29
3.10 EXPRESSÃO GÊNICA E TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS A PRODUÇÃO ANIMAL.....	30
3.10.1 Extração e verificação da qualidade do RNA	30
3.10.2 Reação em cadeia polimerase (PCR)	32
3.10.3 PCR em Tempo Real (qPCR)	33
3.10.4 Ferramentas de análises genômicas na produção animal	34
3.11 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)	35
3.11.1 Sequenciamento de RNA (RNA-Seq)	36
3.12 METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO ILLUMINA	37
3.12.1 Controle de qualidade	38
3.12.2 Mapeamento de reads	40
3.12.3 Normalização	40
3.12.4 Análise da expressão gênica diferencial	41
3.12.5 Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos	41
4. OBJETIVOS	43
REFERENCIAS	44
CAPITULO I	50
<i>CYP24A1</i> and <i>TRPC3</i> gene expression in kidneys and their involvement in calcium and phosphate metabolism in laying hens	50
CAPÍTULO II	85
Análise do perfil do transcriptoma do duodeno de galinhas poedeiras submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio de fósforo.....	85

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de postura se tornou uma das principais atividades agropecuárias, destacando-se pelo seu grande crescimento produtivo. Os avanços nos fatores nutricionais, de ambiência, manejo, tecnologia e melhoramento genético colaboraram para isso (ARAÚJO et al., 2008; GLOUX et al., 2020). O Brasil está no sexto lugar entre os países que mais produzem ovos, sendo este, considerado uma das principais fontes de proteínas mundialmente produzidas (AMARAL et al., 2016).

A melhora nos índices produtivos ocorreu pela significativa evolução das poedeiras, em decorrência do melhoramento genético das linhagens, que resultou em aves mais produtivas e longevas (OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, os sistemas de criação também foram otimizados, proporcionando o melhor bem estar animal (PATRICIO et al., 2012). Porém, a otimização dos sistemas são constantes e necessários para alcançar o máximo potencial produtivo das aves (PAULINO et al., 2019).

Considerando a produção de ovos, problemas relacionados à qualidade da casca são responsáveis por perdas significativas, estima-se que cerca de 10 a 15% dos ovos produzidos por poedeiras comerciais sejam perdidos por apresentarem má qualidade de casca (CARVALHO, 2013). A diminuição da qualidade da casca do ovo com o avanço da idade das galinhas é uma das principais preocupações, pois a incidência de ovos quebrados tende a aumentar no final do período de postura (NUNES et al., 2013). O fator determinante para uma boa produção está relacionado com uma boa suplementação mineral, e isso se tornou um desafio contínuo na nutrição de poedeiras, pelas constantes manipulações dietéticas realizadas durante as diferentes fases de postura (RODRIGUES, 2016).

Os principais minerais envolvidos na formação da casca do ovo, e na estrutura óssea de poedeiras são cálcio (Ca) e o fósforo (P), que participam de muitos processos biológicos importantes (COSTA et al., 2008). Entretanto, o uso pelo organismo animal só é eficiente quando existe um balanceamento adequado, devido o antagonismo existente entre Ca e P, o que tornou-se um desafio na suplementação mineral, principalmente após o pico de postura, e o avanço da idade das poedeiras (PROSZKOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013).

Com os avanços da genética molecular e estudos de expressão gênica existem novas perspectivas para elucidação da relação entre genes e seus fenótipos correspondentes, tornando possível a compreensão de mecanismos relacionados a nutrição e seus efeitos no desempenho dos animais. Neste contexto, algumas técnicas utilizadas para mapeamento de características de interesse possibilitaram a compreensão da expressão gênica em diferentes tecidos (OZSOLAK et al., 2009). Técnicas como, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e qPCR (PCR quantitativa em tempo real), permitem realizar essa avaliação em características de interesse através da expressão gênica (ROSA; ROCHA; FURLAM, 2007). Além disso, na última década, a técnica sequenciamento de RNA (RNA-Seq), baseada no sequenciamento de nova geração (NGS), tem permitido avaliar os transcritos e seus níveis de expressão global em diferentes tecidos e grupos, possibilitando uma melhor compreensão de processos e mecanismos fisiológicos importantes (HAAS; TORRES, 2017).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados aos mecanismos de absorção e regulação de Ca e P no duodeno e rim de galinhas poedeiras que receberam diferentes níveis de cálcio e fósforo na dieta. Para isso, o perfil de expressão global do duodeno foi analisado por meio de RNA-Seq, enquanto genes candidatos, relacionados com mecanismos que envolvem Ca e P, foram avaliados no rim utilizando qPCR, a fim de compreender o perfil de expressão gênica e processos biológicos envolvidos na resposta de diferentes níveis de Ca e P na dieta e sua influência no desempenho dos animais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 AVICULTURA DE POSTURA NO BRASIL

A avicultura de postura desempenha um papel fundamental no agronegócio brasileiro e no desenvolvimento do país, por gerar empregos de forma direta e indireta, além de produzir um alimento altamente nutritivo e de baixo custo (GARCIA; GOMES, 2019). Dados apresentados no ano de 2017 informavam sobre o crescimento em produção nos últimos 30 anos, com apenas algumas pequenas retrações, subentendendo que estas seriam relacionadas a fatores nutricionais, como, variações em preço de insumos, que constantemente afeta de forma direta a produção animal (Figura 1) (ABPA, 2021).

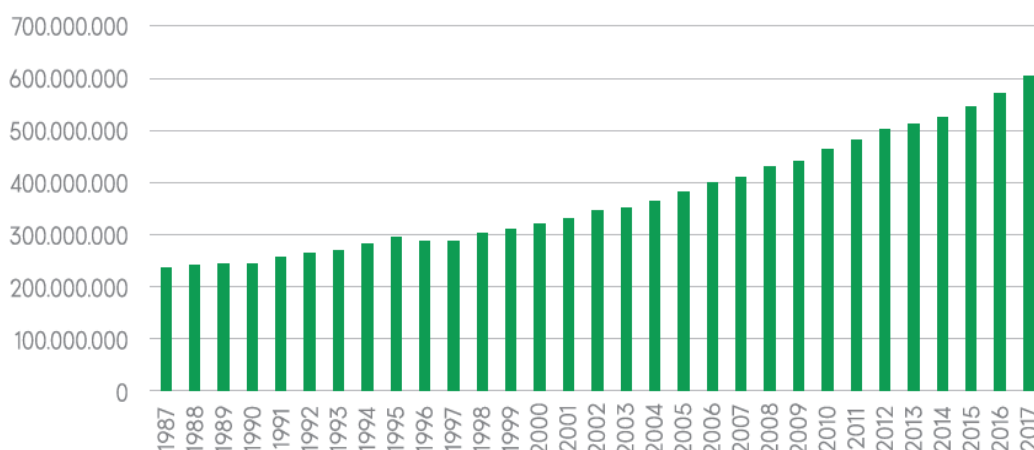


Figura 1. Evolução da produção de ovos no Brasil em 30 anos, produção de ovos (mil dúzias). Fonte: Silva, 2019.

A evolução produtiva continua em grande crescimento e dados apresentados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) mostram que no ano de 2020 a produção de ovos foi de 53 bilhões de unidades, com o consumo *per capita* de 251 unidades. E a estimativa para 2021 possui uma previsão de alcance de 56, 2 bilhões de ovos produzidos (ABPA, 2021). Cerca de 99,7% foi destinada apenas para o mercado interno e apenas 0,3% destinada ao mercado externo. Sobre as exportações, 64,45% foi exportado o produto *in natura*, e 35,55% na forma industrializada (ABPA, 2021).

O Brasil está no sexto lugar entre os países que mais produzem ovos no mundo, estando atrás apenas da China, Estados Unidos, Índia, Japão e México

(GARCIA; GOMES, 2019).

3.2 MELHORAMENTO GENÉTICO NA AVICULTURA DE POSTURA

Os primeiros trabalhos sobre melhoramento genético na avicultura iniciaram na década de 60, onde buscava-se melhorar geneticamente as linhagens comerciais, para que houvesse a redução na dependência de material genético de importação externa (COUTINHO et al., 2007). A seleção ocorreu sobre diferentes características de produção, como: na seleção da maturidade sexual, fertilidade, menor peso das aves no início e final da postura, maior peso inicial do ovo, qualidade dos ovos e resistência da casca (COUTINHO et al., 2007).

No Brasil, em de 1957, iniciou-se um programa de melhoramento que visava a obtenção de aves poedeiras comerciais realizada pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Centro-Sul, atual Pesagro – (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro) (FILHO, 1999). Neste mesmo período, a Granja Guanabara, já desenvolvia projetos voltados a melhoramento de aves poedeiras, e iniciava um programa para aves de corte. Na mesma época a Granja Guanabara iniciava seus projetos com o melhoramento genético em aves de corte, envolvendo raças como, Cornish Branca, New Hampshire e Plymouth Rock Branca (SCHMIDT; ÁVILA 1990).

Outras instituições de estudo na época também iniciaram trabalhos com melhoramento de aves: na década de 1960, a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), seguido pelo Instituto de Zootecnia (IZ), em Nova Odessa. Em 1970, também a Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Universidade Federal de Santa Maria (UFMS). Em seguida, 1993, o Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (Embrapa Suínos e Aves) iniciou trabalhos de melhoramento, por meio do melhoramento genético de aves de corte, e após ampliando para linhagens de poedeiras, pela transferência de aves da Granja Guanabara para a Embrapa, devido a Granja Guanabara passar por período de falência (LEDUR; NONES; ROTA BERTANI, 2009).

Na Embrapa Suínos e Aves, desde 1982, foram desenvolvidas linhagens que deram origem a cinco pacotes genéticos, destinados ao mercado brasileiro:

Embrapa 011 - poedeiras de ovos brancos, composto por duas linhas puras da raça White Leghorn, selecionadas para produção intensiva de ovos, a Embrapa 031 (poedeiras de ovos castanhos) composta por três linhas puras, sendo duas da raça Rhode Island Red e uma raça Plymouth Rock Branca selecionada para produção intensiva de ovos de mesa, Embrapa 051 (poedeira colonial de ovos castanhos), sendo estas híbridas, originadas do cruzamento entre as linhas Rhode Island Red e Plymouth Rock Branca. São aves rústicas, selecionadas para produção de ovos de mesa da casca marrom (LEDUR; NONES; ROTA BERTANI, 2009).

Mesmo com muitos centros de pesquisa desenvolvendo seus programas de melhoramento genético de aves na época, devido a abertura do mercado durante a década de 1990 houve a redução de investimentos governamentais na área, que impossibilitou a continuidade de tais programas. Mesmo sem perspectivas de programas de melhoramento genético no Brasil, houve um grande crescimento na área da biologia molecular, possibilitando a investigação e identificação de genes e polimorfismos genéticos (COUTINHO; DO ROSÁRIO; JORGE, 2010).

Além disso, a descoberta da primeira versão completa do genoma da galinha revelou um genoma com tamanho relativamente pequeno de 1 bilhão de pares de bases, como das aves em geral e a presença de aproximadamente 20-23.000 genes (HILLIER et al., 2004; PAIVA et al., 2010). A disponibilização de informações mudou o cenário da pesquisa em avicultura, possibilitando uma abordagem mais robusta para diferentes características de interesse econômico (PARK et al., 2004).

Com a propagação de interesse em fatores genéticos aliados a produção, muitos estudos foram realizados. Alguns foram baseados em estratégias de microssatélites e posteriormente em SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) espalhados pelo genoma que por meio de mapeamento de QTLs (*quantitative trait loci*) identificaram regiões cromossômicas associadas à variação genética de características de interesse (LEDUR et al., 2002). Portanto, técnicas de biologia molecular associadas possibilitam compreender muitos mecanismos fisiológicos relacionados a características de interesse, buscando aumento e eficiência nos sistemas de produção animal.

3.3 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS CA E P NA AVICULTURA DE POSTURA

O principal desafio na nutrição de poedeiras comerciais está baseada na adequada suplementação. Minerais quando fornecidos em baixos níveis acabam resultando em deficiências nutricionais, quando em excesso também pode afetar o aproveitamento pelo organismo. Portanto, as suplementações são extremamente necessárias, pois as aves não possuem a capacidade de suprir suas necessidades metabólicas apenas com a matéria-prima fornecida. Por isso, as estratégias de suplementação com níveis adequados são importantes para que as aves possam atingir o máximo potencial de produção (ARAÚJO et al., 2008; PINTO et al., 2012).

Os minerais são divididos em macro e microminerais, os mesmos estão classificados de acordo com as concentrações dos elementos no tecido, indicando suas necessidades orgânicas (AMARAL et al., 2016). Sendo assim, os principais minerais na nutrição de poedeiras são os macrominerais cálcio e fósforo, e por participarem de muitas funções vitais estão disponibilizados em maior abundância no organismo, constituídos na base da formação esquelética e formação na casa do ovo (CARVALHO; FERNANDES, 2013).

Além deles, sódio, enxofre, cloro, potássio e magnésio, considerados também como macrominerais, estão distribuídos em maior concentração em tecidos moles, fazendo o controle e equilíbrio ácido básico orgânico. Participam principalmente como agentes catalíticos nas reações do metabolismo (ARAÚJO et al., 2008). Os minerais atuam na manutenção do pH do sangue, pressão osmótica e balanço da água corporal, na excitação dos nervos e músculos, transporte de nutrientes através de membranas e na regulação da permeabilidade das membranas de vários tecidos, e também compõe muitas enzimas (NUNES et al., 2013).

Existem duas diferentes formas de fornecer os minerais na nutrição: na forma orgânica (quelatos, proteínatos e polissacarídeos) e na forma inorgânica (cloretos, óxidos, sulfatos, carbonatos e fosfatos). A forma inorgânica é mais utilizada por apresentar custo mais baixo (GARCIA et al., 2015). Por outro lado, minerais orgânicos, possuem absorção por carreadores intestinais, aminoácidos e peptídeos, evitando a competição entre os minerais pelos mesmos mecanismos de absorção, sendo uma ótima alternativa para a nutrição de aves,

porém existe um elevado custo inviabilizando o seu uso (RUTZ et al., 2009).

O fósforo é um dos minerais mais caros, devido a reduzida oferta de fósforo disponível (Pd), suas formas de implementação na dieta são: a fonte padrão de fósforo inorgânica e orgânica fosfato bicálcico, ou farinhas de carne e ossos respectivamente (LIU; CHEN; ADEOLA, 2013). A representividade do total de custos na nutrição animal, ficam em torno de 65% a 70%, na cadeia da avicultura de postura. Portanto, torna-se fundamental avaliar os fatores que interferem na relação custo benefício (LICHOVNIKOVA, 2007).

3.5 FISIOLOGIA METABÓLICA DO CÁLCIO

O cálcio é o mineral mais abundante no organismo de poedeiras, atua em muitas funções importantes no organismo, sendo essencial nas células vivas e fluido extracelular; atua na ativação enzimática, transmissão de estímulos nervosos, contração muscular e coagulação sanguínea (BETERCHINI, 2014). O Ca compõe 99% da estrutura óssea, atua na deposição de Ca e composição da casca do ovo. Os ossos são reservatório de cálcio durante toda a vida animal, sendo que 1% de Ca restante fica presente na participação ativa do sistema celular, como na produção de ATP e processos energéticos (ALMEIDA PAZ et al., 2009).

O Ca encontra-se em três diferentes formas no organismo das aves, sendo a principal na forma de hidroxipatia $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013). Diferentes hormônios atuam no balanço do Ca, a regulação ocorre pelo estrogênio, paratormônio (PTH), calcitonina e vitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃), e o controle efetivo pela absorção intestinal, reabsorção óssea e eliminação renal. A presença de receptores de membrana sensíveis ao Ca nesses órgãos são fundamentais para a regulação mineral (BUZINARO; DE ALMEIDA; MAZETO, 2006).

Quando ocorre redução de Ca no sangue o PTH é secretado, estimulando a reabsorção óssea, e aumentando a atividade osteoclástica, reduzindo a excreção renal e incrementando a absorção intestinal de Ca, por meio da ativação da vitamina D₃ e da calbindina (CaBP-9k). Em casos de hipercalcemia, a calcitonina atua de forma inversa ao PTH, que estimula a sedimentação óssea de Ca, por meio da atividade osteoblástica, aumentando a eliminação de cálcio

pelos rins, reduzindo a absorção intestinal por meio da desativação da vitamina D₃ ativa (Figura 2) (LEESON; SUMMERS, 2008).

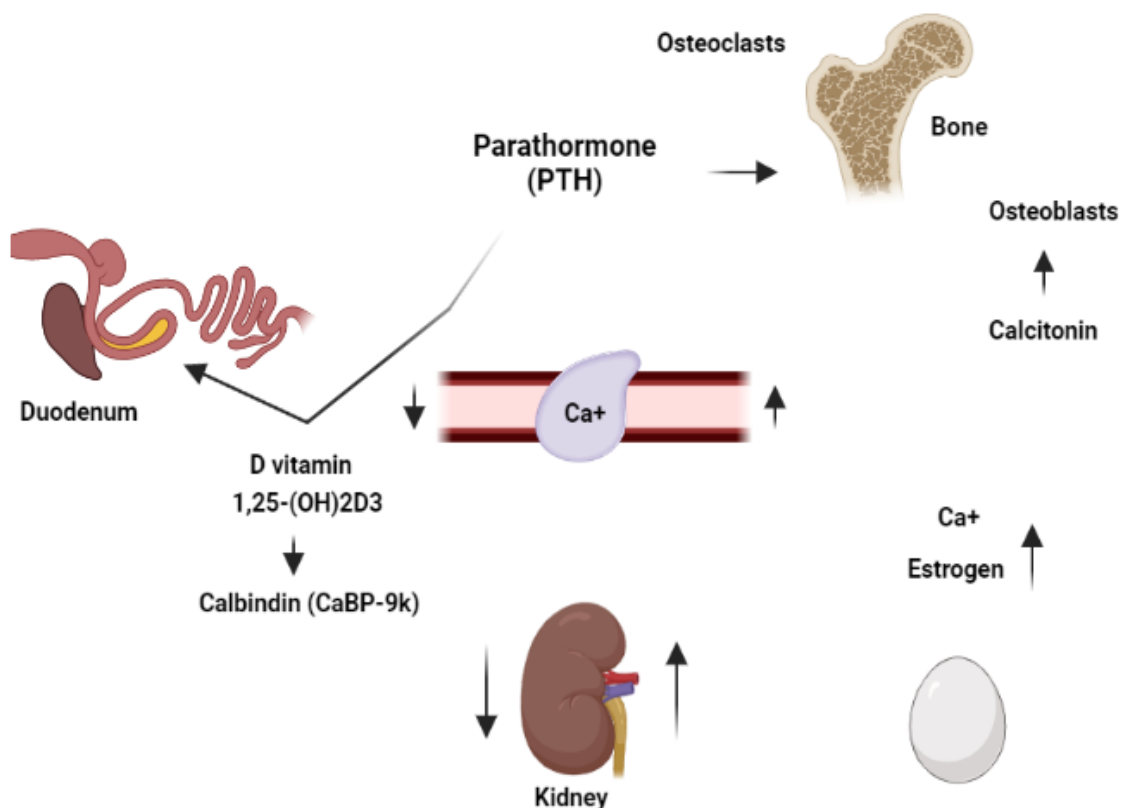


Figura 2. Esquema dos mecanismos fisiológicos que ocorrem na regulação de cálcio em poedeiras.

Os estrógenos também atuam por meio da atividade osteoclastica, regulando os níveis sanguíneos pela ação do PTH. A elevação do estrogênio no sangue de galinhas ocorre no início da postura e é acompanhado pelo aumento do nível sérico de Ca, preparando para a grande demanda de Ca necessária para a formação da casca do ovo (BERTECHINI, 2014). Muitos fatores podem interferir na absorção de Ca, como idade, fontes biodisponíveis, balanceamento inadequado dos minerais na dieta, a formulação entre quantidade de outros minerais, além da suplementação de vitamina D na dieta (BETERCHINI, 2014).

O controle da excreção de Ca é determinado pela quantidade de Ca e P no plasma, a excreção é influenciada de forma direta pela absorção e utilização desses minerais. Com baixos níveis de Ca, o PTH atua através de receptores sensíveis ao Ca, reduzindo de forma direta a excreção de Ca via urina, e de forma indireta pela vitamina D, que realiza a absorção de cálcio pelo intestino,

ajudando na diminuição da excreção via renal (LEESON; SUMMERS, 2008).

A deficiência de Ca resulta em baixo consumo de ração, retardo no crescimento, raquitismo, andar e postura anormais, ovos de casca fina, maior volume de urina, tetania, osteoporose e vida útil reduzida (ITO et al., 2006). Quando ocorre déficit mineral, a ovulação pode cessar, porém, quando se insere novamente níveis adequados na dieta, as aves retornam normalmente a produção de ovos em torno de 6 a 8 dias, com qualidade normal da casca e ossos fortalecidos. Mas na maioria das vezes, a ovulação continua e a ave depende intensivamente da reabsorção óssea (ARAÚJO et al., 2008); LEESON; SUMMERS, 2008).

No entanto, a função nutricional do Ca é dependente da quantidade de P disponível na dieta, e a relação entre ambos deve ser equilibrada, pois existe um antagonismo entre eles, sendo esse um dos fatores críticos para absorção e aproveitamento dos minerais (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013).

3.6 FISIOLOGIA METABÓLICA DO FÓSFORO

Depois do Ca, o P é o mineral mais abundante, sendo que mais de 80% do P está associado ao Ca na formação óssea, proporção de 1:2 com o Ca na hidroxiapatita. O P desempenha um papel importante no metabolismo energético, dos carboidratos, aminoácidos, gordura, dos tecidos nervosos, coordenação muscular, crescimento esquelético, transporte de ácidos graxos e outros lipídios. Além disso, é uma parte importante dos ácidos nucleicos, ATP, DNA e RNA (VELLASCO et al., 2016).

Para a formação da casca do ovo, o P atua na redução da acidose sanguínea e recomposição dos ossos medulares. O P está presente na forma orgânica e inorgânica no sangue, na concentração em níveis entre 35 a 45 mg/100mL (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013). Os processos metabólicos de P estão associados com o do Ca, sendo dependentes da absorção intestinal, reabsorção óssea e eliminação renal (GLOUX et al., 2020). Diferente do que ocorre com o Ca, a absorção de P diminui e aumenta a excreção renal, para diminuir e adequar o excesso dos níveis no sangue. Em casos de hipercalcemia, a calcitonina estimula à sedimentação óssea de Ca e P. A atividade osteoblástica aumenta a eliminação de Ca pelos rins, reduzindo a absorção intestinal com a

desativação da vitamina D3 ativa (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013).

Os estrógenos regulam os níveis de P através da atividade osteoclástica, sendo a mesma mediada pelo PTH. No início da postura, o aumento de estrogênio no sangue das galinhas é acompanhado pelo aumento do nível de Ca e P. Portanto, na formação da casca do ovo, o excesso de P no sangue é eliminado devido o aumento da excreção renal (BERTECHINI, 2014). O P é absorvido pelo intestino pelo processo de difusão simples seguindo o gradiente de concentração ou por transporte ativo, processo que só ocorre na presença de vitamina D, possibilitando que o P seja absorvido na forma de ortofosfato (PO_4) (BERTECHINI, 2012).

O Ca na dieta também desempenha importante função na absorção do P no intestino delgado das aves, de forma que Ca e P juntos provocam efeitos relevantes na expressão da calbindina no duodeno. Além disso, a expressão da calbindina D28k e o receptor da vitamina D sugerem o envolvimento dos mesmos na atuação da regulação de Ca e P. O P absorvido entra na corrente sanguínea e seu mecanismo de transporte é regulado pelos sistemas hormonais (LEESON; SUMMERS, 2008).

A excreção é influenciada de forma direta pela absorção e utilização desses minerais pelo animal. Em situações de baixo nível de Ca e alto nível de P, o PTH exerce sua ação sobre os ossos, liberando íons fosfato na circulação, aumentando a excreção de P e reduzindo a de Ca. Por sua vez, com altos níveis de Ca e P, a calcitonina estimula a sedimentação óssea e excreção do excesso destes minerais (GLOUX et al., 2020).

A deficiência de fósforo ou um grande desequilíbrio na relação Ca:P da dieta pode reduzir os níveis sanguíneos desses minerais, isso porque qualquer um destes elementos em excesso reduz o aproveitamento do outro no intestino (BARRAL; BARROS; ARAÚJO, 2007). Animais com deficiência em P podem apresentar redução do consumo de ração, fragilidade óssea aumento da mortalidade e deformação na casca dos ovos nas aves adultas (BERTECHINI, 2014). Deste modo, torna-se necessário compreender a necessidade metabólica de poedeiras, pois o desempenho produtivo está relacionado com a disposição mineral e uma boa eficiência metabólica, resultando na formação de ovos com boa qualidade da casca.

3.7 FORMAÇÃO DA CASCA DO OVO

A mineralização da casca do ovo tem início no istmo, onde ocorre a deposição sobre a membrana exterior da matriz de compostos orgânicos, e diferentes tipos de proteínas desta matriz regulam a mineralização da casca. A calcificação é resultado da precipitação controlada de carbonato de Ca (CaCO_3), sobre as fibras de membrana externa (SCOTTÁ et al., 2014). Durante a mineralização, a casca é banhada pelo fluído uterino contendo cerca de 6 a 10 mM de Ca ionizado e 70 mM de íons bicarbonato. Assim, neste meio supersaturado, o carbonato de Ca precipita-se espontaneamente na forma de calcita. A casca mineralizada consiste de aproximadamente 95% de carbonato de Ca sob a forma de calcita, sua forma mais estável (LEESON; SUMMERS, 2008). A quantidade de Ca depositada na casca do ovo é próxima de 10% do estoque total de Ca no corpo da ave, sendo que cerca de 99% de Ca total, está contido nos ossos (ALMEIDA PAZ et al., 2009).

Apesar do P não participar diretamente da formação da casca, ele é essencial para períodos de calcificação óssea ativa e de reabastecimento de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nos ossos medulares. Durante a mobilização do Ca do osso medular há liberação concomitante de P, e a maior parte deste P será excretado na urina, desde que não haja necessidade metabólica imediata para este pico de P. Este mecanismo contribui para controlar a acidose durante a fase de maior calcificação da casca (LEESON; SUMMERS, 2008). Assim, a exigência de P das poedeiras está associada à exigência de Ca, bem como à dinâmica da medula óssea. Além disso, o P é detectado nas camadas mais externas da casca do ovo. É possível que os íons de fosfato possam inibir a precipitação do carbonato de Ca, juntamente com as proteínas uterinas, tendo uma contribuição relativa na conclusão do processo de calcificação da casca (LEESON; SUMMERS, 2008).

O declínio na qualidade da casca com o aumento da idade das galinhas pode ser atribuído a um distúrbio do metabolismo da vitamina D_3 , ligado a deficiência na biossíntese de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (SCOTTÁ et al., 2014). A qualidade da casca do ovo é determinada por aspectos externos, como a sua estrutura, e os aspectos internos são determinados pelo tamanho do albúmen, gema, câmara-de-ar, cor, odor, sabor (NUNES et al., 2013).

A casca do ovo representa cerca de 9,5% do peso total do ovo, a gema 29% e o albúmen 61,5%. A parte mineral é composta por 98,2% de carbonato de cálcio, 0,9% de carbonato de magnésio e 0,9% de fosfato de cálcio (SOHAIL; ROLAND, 2002). A percentagem de casca é afetada pela idade da poedeira, aves mais jovens apresentam maior percentagem (PATRICIO et al., 2012). A idade das aves determina a habilidade de absorção de cálcio intestinal e mobilização do cálcio ósseo. A taxa de retenção de cálcio em poedeiras jovens é de 60%, já em poedeiras velhas essa taxa cai para 40% (PROSZKOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013).

As aves velhas, assim como aquelas que produzem ovos com casca de qualidade ruim, têm uma menor atividade da enzima anidrase carbônica, o que leva a uma menor calcificação da casca do ovo (ROBERT, 2004). Do início ao fim do ciclo de postura, o ovo aumenta até 40% do seu tamanho, diminuindo a quantidade de Ca na superfície da casca e seu tamanho, o que resulta em uma casca com menor resistência a quebra (ARAÚJO et al., 2007).

3.8 ESTUDOS DE CA E P NA NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS

Muitos estudos já foram realizados em comparação de diferentes dietas com níveis de cálcio e fosforo, mas ainda são poucas as informações existentes para a elucidação dos mecanismos referentes a absorção e regulação em galinhas poedeiras. Distúrbios metabólicos durante a fase de postura tendem a reduzir a produtividade, além de comprometer o bem-estar dos animais, comprometendo a vida produtiva. Os processos de regulação mineral ocorrem através de diferentes receptores, órgãos e hormônios (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013).

Os estudos baseados na compreensão da regulação dos minerais, são relacionados principalmente a frangos de corte, existindo poucas informações relacionadas a poedeiras com idade avançada e final de fase de postura. Alguns estudos realizados tratam principalmente da relação de desempenho dos animais diante de diferentes formulações de cálcio e fósforo na dieta. Em um estudo realizado por Almeida Paz et al. (2009), o trabalho desenvolvido buscou avaliar a densidade mineral óssea, dos ossos da tíbia e do fêmur em aves com diferentes idades, sendo elas 12, 22, 28, 34, 40 semanas.

Foram implementadas duas dietas com níveis adequados (3,8%) e baixos (1,8%) de cálcio. Valores de produção de ovos, massa e qualidade da casca foram avaliados, a fim de investigar a influência dos níveis na produção e resistência óssea. Concluíram que as aves mobilizaram por meio da atividade óssea resgate de cálcio independente do tratamento, e em níveis baixos de cálcio houve queda na qualidade da produção, por danos apresentados na casca dos ovos. Em um experimento realizado com poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade, objetivou-se determinar a exigência e a melhor relação de Ca:P para aves da linhagem Hy-line W-36, onde foram fornecidos três níveis de cálcio (3,9; 4,2 e 4,5 %), e três relações de Ca:P (9,3; 10,53 e 12,12/1).

Foram avaliados os parâmetros de desempenho produtivo, qualidade do ovo, as características ósseas, o balanço de cálcio e fósforo e a mortalidade. Como resultado não houve interação entre os níveis de cálcio e as relações Ca:P para nenhuma das variáveis, porém os níveis de cálcio promoveram efeito significativo sobre o peso e porcentagem da casca, cálcio na casca, ovos perdidos, consumo de cálcio e fósforo, cálcio e fósforo na excreta, cálcio e fósforo retido. A relação Ca:P influenciou significativamente o consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, consumo mineral pelos animais, fósforo na excreta e fósforo retido. Rações contendo 4,5% de cálcio e relação Ca:P, correspondendo ao consumo de cálcio de 3,71 g/ave/dia e de fósforo de 360 mg/ave/dia, foram as mais satisfatórias frente o estudo realizado (VELLASCO et al, 2016).

Em dietas contendo 2,5% de cálcio; 3,0% de cálcio; 3,5% de cálcio; contendo 4,0% de cálcio e contendo 4,5% de cálcio, foram avaliados parâmetros de desempenho e qualidade da casca, com aves da linhagem Dekalb White light com 56 semanas de idade. Como resultado, não houve diferenças entre os tratamentos para a produção de ovos, viabilidade e porcentagem de gema e albumina. Porém o consumo de ração, a conversão alimentar e a perda de ovos diminuíram na medida em que os níveis de cálcio aumentaram. A gravidade específica e a espessura da casca aumentaram com o aumento dos níveis de cálcio. Níveis ótimos de cálcio foram encontrados em 3,79% e 4,19% para peso máximo do ovo e porcentagem da casca, respectivamente. Concluiu-se que a recomendação seria de 4,19% de cálcio para poedeiras com idade de 56-67 semanas (LOURENÇO, 2012).

3.9 NUTRIGENÔMICA

A nutrigenômica baseia-se em revelar mecanismos de interação entre certos nutrientes (KORE; PATHAK; GADEKAR, 2008). De maneira geral, através dela é possível melhorar a produtividade animal através de dietas personalizadas, sendo esta considerada uma abordagem poderosa para desvendar e elucidar a complexa relação entre as moléculas nutricionais, com polimorfismos genéticos, além de compreender o sistema biológico como um todo (RUTZ et al., 2009).

Através de nutrigenômica é possível compreender a influência da dieta na estrutura da expressão de genes, com a obtenção dos dados genéticos do indivíduo e os fenotípicos, alcançando conclusões sobre o desempenho produtivo, sanidade e bem estar animal. Através da ciência moderna, foi possível compreender que não somente alguns nutrientes são essenciais, mas que, além disso, as quantidades fornecidas são importantes (MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005; SORDI, 2019).

Na avicultura industrial, o maior desafio está relacionado com a concordância da disposição mineral após o pico de postura das aves, para evitar a redução no desempenho metabólico dos animais e permitir a mineralização eficiente da casca do ovo (ALMEIDA PAZ et al., 2009). Com a descoberta do genoma da galinha (*Gallus gallus*), houve um avanço na compreensão da variação genética. Portanto, através de metodologias na área molecular, existe a possibilidade de realizar investigações sobre mecanismos fisiológicos que ocorrem no organismo dos animais, e compreender as interações dietéticas, sob o ponto de vista econômico (COUTINHO; DO ROSÁRIO; JORGE, 2010).

A genômica analisa milhares de genes utilizando técnicas aliadas à bioinformática, possibilitando a análise simultânea de toda a informação, para posteriormente interpretar os dados. Essa grande quantidade de informação possibilitou o desenvolvimento de plataformas analíticas completas, programas apropriados para armazenamento, organização e análise dos dados gerados, além de revolucionar a nossa abordagem para compreensão da saúde e das características de desempenho de aves (KORE; PATHAK; GADEKAR, 2008; RUTZ et al., 2009).

A nutrição pode alterar a expressão fenotípica, estando totalmente envolvida na produção animal. O grande desafio da nutrição moderna é o desenvolvimento de programas nutricionais que satisfaçam as exigências dos grandes avanços proporcionados pela genética (NUNES et al., 2013).

3.10 EXPRESSÃO GÊNICA E TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS A PRODUÇÃO ANIMAL

Os genes são as regiões contidas no DNA que realizam um processo chamado transcrição. Este processo consiste na produção de moléculas de RNA, a partir do DNA. As moléculas de RNA, também chamadas de transcritos, tendem a apresentar diferentes funções, servindo como molde para o processo chamado tradução (SAN et al., 2021). A avaliação do nível de transcrição dos genes é essencial para compreender o funcionamento dos mecanismos biológicos, uma vez que a maioria das atividades biológicas é regulada principalmente pelo controle da expressão de vários genes.

Desta forma, compreender os princípios que comandam esses mecanismos complexos torna-se importante para a compreensão de doenças, distúrbios e outras características, bem como características de interesse econômico na produção animal (MACIEL; BRITO; SILVA, 2020). Uma das formas mais comuns de estudos de expressão gênica se dá pela utilização do mRNA, que precisa ser isolado previamente a sua análise. As técnicas mais comumente utilizadas em análises de expressão gênica são descritas abaixo:

3.10.1 Extração e verificação da qualidade do RNA

Primeiramente existe a necessidade de realizar a extração do RNA do material biológico que pretende-se investigar. Além disso, é necessária a avaliação da qualidade e pureza do RNA extraído. O RNA difere-se do DNA em apenas três pontos principais: o açúcar ribose, a base pirimídica uracila e por ser fita simples. O RNA encontra-se no citoplasma das células e deve ser obtido do local onde se pretende avaliar a sua expressão, pois a função gênica pode ser diferente em cada tecido/célula específico (BARBAS, 2007).

Para isolamento do RNA, os métodos são baseados na lise e desnaturação das células permitindo a liberação dos ácidos nucleicos totais e

presença de inibidores que impedem a ação de ribonucleases (RNAses) (SAMBROOK, 2002). A principal dificuldade na extração de RNA está relacionada a grande quantidade e presença de ribonucleases (RNAses) estáveis e ativas na amostra, que permitem que este seja rapidamente degradado (SAMBROOK, 2002).

Existem muitos reagentes próprios que possibilitam a extração mais rápida de RNA, que garantem uma melhor integridade do material. Existem diferentes maneiras de realizar a extração do RNA, sendo pelo uso do reagente de Trizol (TAN; YIAP, 2009). Outra metodologia para extração de RNA utiliza ligação a coluna sílica, onde a extração ocorre por meio da combinação das propriedades de ligação seletiva da membrana da base sílica com a velocidade decorrente da centrifugação, realizando a separação do RNA (ESCOBAR; HUNT, 2017; MESQUITA et al., 2001). Outro método utiliza esferas (*beads*) magnéticas, em que a extração de RNA ocorre devido às cargas positivas, quando o pH circulante é inferior a 6,0 e cargas negativas quando superiores a 8,0. O RNA carregado naturalmente pode ser ligado ou liberado da superfície das *beads*. (SHI et al., 2015).

Após a extração do RNA, é necessária a etapa de purificação, para manter a integridade e pureza do material (KUBISTA et al., 2006). Os métodos convencionais para avaliar a integridade de RNA incluem eletroforese e espectrofotometria (GARIBYAN; AVASHIA, 2013). Essas são duas metodologias convencionais, porém elas necessitam de grande quantidade de amostra, e também dependem das condições da eletroforese, ou a incapacidade de detectar a contaminação com DNA (BARBAS, 2007). Além dessas duas metodologias convencionais, pode ser utilizada uma plataforma microfluídica baseada em eletroforese capilar, que pode ser usada para quantificar, bem como avaliar a integridade do RNA de maneira rápida e confiável, através do Agilent 2100 Bioanalyzer, que permite o mínimo consumo de amostra (SCHROEDER et al., 2006).

A eletroforese promove a separação de fragmentos de acordo com suas cargas e pesos moleculares, através de um campo elétrico, além de ser utilizada para identificar e purificar moléculas (GROSSMAN et al., 2012). Através da eletroforese, as moléculas realizam a migração em direção ao polo oposto, devido a diferença entre a carga e a massa, sendo diretamente proporcional ao

tamanho das moléculas, determinando a migração em diferentes velocidades resultando na separação das moléculas. A eletroforese em gel de agarose é o método mais fácil para visualizar e analisar o produto de PCR e permite a determinação da presença e tamanho do produto de PCR (BIER, 2013).

3.10.2 Reação em cadeia polimerase (PCR)

A técnica permite a realização da síntese de DNA *in vitro*, com a geração de várias cópias da fita de DNA (TAYLOR et al., 2010). A enzima polimerase é a responsável pela replicação do DNA, mas para que essa enzima atue de forma eficaz na reação existe a necessidade do uso de três componentes: primers, moldes e os nucleotídeos, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T) (GREEN; SAMBROOK, 2019). Os primers são sequências iniciadoras do processo, que correspondem a curtas cadeias de nucleotídeos complementares a fita direta: primer (*forward*) e fita complementar (*reverse*) da sequência alvo. Eles se unem por complementaridade entre suas bases, em uma mesma reação, entre primers e a sequência, qual está presente na forma desnaturada (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). Estes são essenciais para o resultado da PCR, sua função é baseada no anelamento na fita positiva, sendo a mesma orientada na direção 5' - 3' (também conhecida como fita de sentido ou não modelo) e o outro primer deve complementar a fita negativa, que é orientada na direção 3' - 5' (anti-sentido ou fita modelo) (TAYLOR et al., 2010).

Para uma reação bem-sucedida de PCR, muitos aspectos são importantes, como a concentração do tampão de PCR, equilíbrio entre as concentrações de cloreto de magnésio e desoxinucleotídeo, temperaturas de ciclo e quantidade de DNA molde e Taq DNA polimerase (HAAS; TORRES, 2017). Uma combinação ideal de temperatura de anelamento e concentração de tampão é essencial para obter produtos de amplificação específicos. A concentração de cloreto de magnésio precisa apenas ser proporcional à quantidade de dNTP, enquanto o ajuste da concentração do primer para cada sequência alvo também é essencial (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002).

Os primers são desenhados baseando-se no molde de DNA genético, que é uma etapa importante para a eficiência da PCR. Portanto, é necessário

conhecimento prévio da sequência do DNA alvo para que os iniciadores possam se ligar durante a reação. Para que exista uma eficiente ligação dos primers à sequência, existem características específicas que devem ser ajustadas para a otimização da reação, como: comprimento dos primers, temperatura de anelamento, tamanho do produto, concentração de magnésio, presença de repetições de nucleotídeos, estabilidade e formação de *hairpins* e dímeros (GIRARDON et al., 2016). (OLIVEIRA et al., 2015).

Problemas podem ocorrer no processo de desenho dos primers, como auto anelamento, resultando em formação de estruturas secundárias, como *loops* e anelamentos de primers entre si, criando dímeros de primer. Temperaturas de anelamento e *melting* muito diferentes entre os primers, fazem com que ambos os primers se liguem de forma eficiente à sua sequência alvo durante o ciclo (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002).

3.10.3 PCR em Tempo Real (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real se diferencia da PCR convencional por possibilitar a monitoração em tempo real do processo de amplificação e quantificação dos ácidos nucleicos, ocorrendo a emissão e captação de fluorescência no processo, gerando um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade do produto da PCR (PABINGER et al., 2014). Para reação de qPCR é necessário um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e captação da emissão, além de um computador com um *software* para obtenção da análise final da reação (NOVAIS; ALVES, 2004).

Existem dois principais sistemas de fluorescência, um do tipo intercalante, sendo o SYBR Green o mais utilizado, e um baseado na utilização de sondas, sendo os sistemas TaqMan, os mais conhecidos. O SYBR Green se liga a qualquer molécula de dupla fita, pois é um fluoróforo não específico que se intercala a dupla fita de DNA. Já o sistema TaqMan consiste na presença de uma sonda ligada a um fluoróforo em uma das extremidades, e na outra uma molécula *quencher*, de modo que no momento da amplificação, a molécula de fluorescência é separada do *quencher*, sendo excitadas e a luz é captada pelo aparelho, gerando um curva de amplificação (KUBISTA et al., 2006).

A reação de qPCR permite a obtenção de dados quantitativos, pois é

possível monitorar desde sua quantidade de partida, quanto sua quantidade do produto de PCR acumulado durante o a ciclagem, sendo que a mesma pode ser verificada durante a fase exponencial da reação (KUBISTA et al., 2006).

A qPCR tornou-se uma técnica definitiva para quantificar diferenças nos níveis de expressão gênica, vem sendo incluída em em diversas áreas da ciência (TAYLOR at al, 2010). Além disso, para apoiar observações fenotípicas com os dados moleculares, a técnica de RT (transcrição reversa) qPCR também vem sendo implementada em ensaios moleculares a partir do RNA, onde ocorre a síntese de cDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) (FLEIGE et al., 2006). Esta é atualmente a técnica mais sensível disponível para detecção e quantificação de mRNA (ROBINSON; OSHLACK, 2010). A síntese de cDNA é muito utilizada para mensuração de expressão gênica, sendo um dos métodos mais confiáveis. A partir do RNA extraído da amostra de interesse, a RT (transcrição reversa), ocorre sob a ação da enzima transcriptase reversa (NASCIMENTO et al., 2015).

3.10.4 Ferramentas de análises genômicas na produção animal

Diversas técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas estrategicamente para identificar mecanismos genéticos associados ao organismo animal (OZSOLAK et al., 2009). As estratégias são relacionadas na identificação de regiões cromossômicas, análise de expressão gênica, uso de genes candidatos e análises do transcriptoma (NAGALAKSHMI et al., 2010).

O mapeamento de QTLs (*Quantitative trait loci*) permite a identificação de regiões cromossômicas associadas a variação genética de características de interesse econômico, a mesma depende do desenvolvimento de mapas genéticos saturados por marcadores moleculares polimórficos e de uma estrutura populacional que apresente segregação para a característica de interesse (WANG et al., 2017).

A mesma possui custo elevado, devido o desenvolvimento de uma população experimental com pelo menos duas gerações, que deve ser fenotipada e genotipada completamente. Também sendo restrita, podendo indicar a região que pode conter genes associados à característica de interesse, porém a região identificada pode conter diversos genes.

Outra abordagem é o Genome-Wide Association Studiesé (GWAS), que permite avaliar a associação entre cada marcador genotipado e um fenótipo de interesse que foi pontuado em um grande número de indivíduos (KORTE et al., 2013). Usado para detectar associações entre variantes genéticas e características em amostras de populações, podendo ser complementar ao mapeamento de QTL (COUTINHO; DO ROSÁRIO; JORGE, 2010; FERNANDES, 2015).

Existe também o uso de genes candidatos para identificação da variação da característica utilizada, permitindo compreender a interação entre o fenótipo/genótipo, geralmente são utilizadas as técnicas de PCR e qPCR para a análise de expressão dos genes candidatos (TELLINGHUISEN et al., 2014).

Outra ferramenta utilizada são os Microarrays de DNA que são capazes de analisar o perfil de dezenas de milhares de genes de forma abrangente, porém, o mesmo depende do conhecimento do genoma a ser estudado (BOWTELL et al., 2003; DUGGAN et al., 1999). No entanto, as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) permitem realizar análises de alto rendimento sem o conhecimento prévio do genoma da espécie a ser estudada, o que torna-se vantajoso para análise de uma amostra (VAN DIJK et al., 2014).

3.11 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

Ao longo do tempo as técnicas de sequenciamento de nova geração, do inglês, *Next generation sequencing* (NGS), tornaram-se mais baratas, avançadas e modernas, permitindo um avanço importante para a elucidação de problemas biológicos pela possibilidade de ser feito em grande escala (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010). Plataformas NGS executam sequenciamento paralelo em massa, durante o qual milhões de fragmentos de DNA a partir de uma única amostra são sequenciados em paralelo (GRADA; WEINBRECHT, 2013). Houve um avanço em termos de velocidade, comprimento dos *reads*, junto com uma forte redução no custo por base. Todas as melhorias juntas possibilitaram novas aplicações provenientes do NGS (VAN DIJK; JASZCZYSZYN; THERMES, 2014).

O sequenciamento de nova geração é uma abordagem que pode ser utilizada para realizar a análise de transcrição de genes a partir do mRNA. O

objetivo baseia-se no estudo do conjunto de moléculas de RNA (mRNA, rRNA, tRNA e RNA não-codificante) em uma única célula, organismo ou tecido, refletindo os genes que estão expressos em qualquer molécula da célula, também referida como perfil de expressão (PARK et al., 2017; ROBINSON; OSHLACK, 2010).

3.11.1 Sequenciamento de RNA (RNA–Seq)

O sequenciamento de RNA tem sido reconhecido como um método eficiente para a descoberta de genes codificantes e não codificantes (HAAS; ZODY, 2010). Esse método permite que ocorra a análise de alto rendimento dos perfis do transcriptoma, sendo essencial para compreender a base molecular dos fenótipos. O princípio baseia-se em identificar e quantificar moléculas de RNA para obter respostas biológicas mais precisas a partir de dados gerados no sequenciamento (MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

É possível descobrir os transcritos correspondentes ao conjunto de RNAs mensageiros que uma célula está expressando, seja em um determinado momento, ou sob diferentes condições (HILLIER et al., 2004). A técnica permite analisar quais genes são diferencialmente expressos, diante de condições diferentes que resultam a certos estímulos, como estresse, infecção ou em tipos celulares específicos, como também em estudos de diferenciação celular (PARKHOMCHUK et al., 2009).

A técnica de RNA–Seq independe do conhecimento prévio do genoma de referência do organismo de interesse. Além disso, a metodologia nos permite entender a localização precisa dos limites de transcrição, mostra a variação da sequência dentro da precisão de uma base e detecta vários níveis de expressão. A técnica ainda independe de altas concentrações de RNA para a realização do sequenciamento (LAW et al., 2020).

Um grande número de leituras pode ser facilmente obtido, sendo sensível o suficiente para detectar a transcrição de gene, mesmo com baixos níveis de expressão, permitindo que muitos fenômenos possam ser investigados, como a ocorrência de SNPs, quando há variação na sequência de DNA, sendo afetada uma base nitrogenada (VAN DIJK; JASZCZYSZYN; THERMES, 2014). Os transcritos fragmentados (*short reads*) são sequenciados e não hibridizados

contra um chip, devendo ser montados ou alinhados com um genoma de referência. Existem diferentes tecnologias de sequenciamento disponíveis e, de forma geral, compartilham das mesmas etapas de pré-processamento e análise de dados de RNA-Seq (MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

Existem três diferentes plataformas utilizadas para o sequenciamento de RNA, sendo: O sistema de pirosequenciamento FLX da 454 Life Sciences (Roche), o Illumina Genome Analyzer (Solexa) e o sistema AB SOLiD (Life Technologies) (MARGUERAT; BÄHLER, 2010). Nas três diferentes plataformas os fragmentos são sequenciados em paralelo, e produzem em grande escala sequências com leituras relativamente curtas. Uma das plataformas mais utilizadas é baseada na metodologia de sequenciamento Illumina (ZALAPA et al, 2012).

3.12 METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO ILLUMINA

A metodologia do sequenciamento Illumina ocorre por síntese usando DNA polimerase, nucleotídeos, terminadores marcados. A plataforma consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em superfície sólida (lâmina de vidro), processo também conhecido como PCR em ponte. O nucleotídeo é modificado com terminador reversível e com fluorocromo clivável (ANDERS; HUBER, 2010). Fragmentos de DNA da amostra são ligados em ambas as extremidades, permitindo sua fixação na lâmina (*slide*) de sequenciamento por hibridização a um dos oligonucleotídeos fixados no suporte. Após o passo de amplificação pela PCR em ponte, uma superfície de sequenciamento (*flow cell*) possui mais de 300 milhões de aglomerados (*clusters*), onde cada aglomerado é composto por cerca de 1000 cópias clonais de uma única molécula (YUAN et al., 2006).

As moléculas de DNA clonadas nos *clusters* são sequenciadas de forma paralela utilizando uma abordagem de síntese de DNA que emprega nucleotídeos especiais contendo terminador reversível e radical fluorescente com porção removível. A incorporação desses nucleotídeos impede que novas bases sejam incorporadas até que o terminador seja removido (FIETTO; MACIEL, 2015). A DNA polimerase utilizada também foi modificada para permitir a incorporação destes nucleotídeos modificados. Os nucleotídeos são marcados com fluorescência, sendo quatro cores diferentes para distinguir entre as

diferentes bases. A posição e a sequência molde de cada cluster são deduzidas pela leitura da cor identificada em imagens de alta resolução obtidas a cada passo de adição dos nucleotídeos (ANDERS; HUBER, 2010).

Para que o sequenciamento conforme descrito acima seja realizado, é necessário o preparo de bibliotecas de sequenciamento que é o preparo das amostras para serem sequenciadas. O objetivo da construção de bibliotecas inclui a fragmentação de RNA, pois ao contrário de pequenos RNAs, como microRNAs (miRNAs), RNAs de interação com Piwi (piRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e muitos outros, onde esses por possuírem tamanho menor, podem ser sequenciados diretamente após a ligação do adaptador, moléculas de RNA maiores devem ser fragmentas em 200-500pb, para que haja compatibilidade com as tecnologias de sequenciamento (VAN DIJK; JASZCZYSZYN; THERMES, 2014). A fragmentação pode ocorrer por hidrólise ou nebulização com o RNA. E com cDNA por tratamento com DNase I ou sonicação. Cada um desses métodos cria um viés diferente no resultado. Por exemplo, a fragmentação de RNA tem pouco viés sobre o corpo do transcrito, mas está esgotada para as extremidades da transcrição em comparação com outros métodos. Por outro lado, a fragmentação de cDNA é geralmente fortemente enviesada para a identificação de sequências das extremidades 3' dos transcritos fornecendo informações valiosas sobre a identidade precisa dessas extremidades (ARYA et al., 2005).

Após o sequenciamento, as sequências são recebidas e então inicia-se uma série de protocolos para análise das sequências, como controle de qualidade e limpeza de dados, mapeamento, normalização, análise de expressão diferencial e anotação dos genes. Estas etapas são descritas abaixo:

3.12.1 Controle de qualidade

Sequenciadores de alto rendimento possuem a capacidade de gerar milhões de sequências em uma mesma corrida, com a geração de muitos dados. É necessário que esses dados passem pelo controle de qualidade (QC) para evitar que ocorram erros em análises posteriores (MARGUERAT; BÄHLER, 2010). Os sequenciadores geram relatórios de qualidade, porém, estes são focados na identificação de problemas que foram decorrentes do próprio

sequenciador (MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

O QC de dados consiste na retirada de regiões não específicas do organismo sequenciado, são retiradas as *reads* duplicadas em casos específicos, adaptadores de sequências super-representadas, variando de acordo com a análise e sequências e bases com baixa qualidade (PARK et al., 2017). Alguns *softwares* são utilizados para esta etapa, como o *Trimmomatic* que realiza o corte das extremidades de *reads* com valores de *Phred* menor que 20, ou *reads* que contenham mais de uma base ambígua, que são representadas no conjunto de dados pela letra “N”, também realiza o corte de *reads* com baixa qualidade, e das *reads* menores que 50 pares de bases (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). A cobertura do sequenciamento influencia nas etapas que serão empregadas, uma vez que um tratamento estridente em um conjunto de dados com baixa cobertura pode resultar no reduzido número de *reads*, inviabilizando determinadas análises (GRADA; WEINBRECHT, 2013). O FastQC é uma ferramenta que proporciona a visualização de um relatório de controle de qualidade que pode detectar problemas que se originam ou no sequenciador ou na biblioteca. A ferramenta foi desenvolvida por grupo de bioinformática do Instituto Babraham e oferece alguns parâmetros de controle de qualidade, como: contagem das sequências, pontuações de qualidade por sequência, contagem de genes, pontuações de alinhamento, níveis de duplicação de sequência (BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017). FastQC pode ser utilizado com dados brutos apenas sequenciados (Fastq), fornecendo uma visão de quão bom está o sequenciamento ou com dados alinhados (*BAM*), para verificar a qualidade dos dados (OZSOLAK et al., 2009).

Com o controle de qualidade objetiva-se realizar uma avaliação das *reads*, após procede-se com a correção, remoção de *reads* que não respeitam os valores mínimos de qualidade (PABINGER et al., 2014). Os erros mais comuns são a baixa qualidade das *reads* e a contaminação pelos adaptadores (DAI et al., 2010). Alguns parâmetros que devem ser levados em consideração são o tamanho de sequências, a qualidade de cada base das *reads*, que são dadas pelos valores de *phred*, número de sequências repetidas (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010).

3.12.2 Mapeamento de *reads*

O mapeamento de *reads* é uma das etapas mais importantes na análise de dados de RNA-Seq, em que ocorre o mapeamento de trechos genômicos sequenciados a partir dos fragmentos de interesse. Portanto, nessa etapa, é necessário transformar milhões de leituras em quantificação de expressão (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010). O mapeamento ajuda a encontrar o local onde cada *read* melhor se alinha com a referência. Devido à presença de DNA repetitivo há a possibilidade das *reads* se alinharem em mais de um local na referência, influenciando a análise de expressão diferencial (TAN; YIAP, 2009). Por isso, esta etapa é importante para garantir que apenas sequências alinhadas em um único local sejam identificadas e utilizadas em análises posteriores. Geralmente este mapeamento é efetuado utilizando os parâmetros *default* dos programas que se destinam a este propósito. O conhecimento aprofundado do organismo que se está trabalhando é essencial para avaliar a necessidade de alteração dos parâmetros *default* destes programas, sendo os mais importantes os parâmetros de cobertura (percentual da referência que foi “coberta” pela *read*) e a identidade (percentual de bases idênticas no alinhamento da referência com a *read*) (ROBINSON; OSHLACK, 2010).

3.12.3 Normalização

A normalização de dados de RNA-Seq é um passo crítico para a obtenção de análise mais precisa na expressão gênica diferencial. Dados provenientes do sequenciamento apresentam diferenças nos números de leituras, devido à variação das condições comparadas, que estão relacionados aos protocolos de preparação de biblioteca. Os problemas referem-se a diferenças do tamanho da biblioteca entre as amostras (cobertura do sequenciamento), e dentro das amostras, como por exemplo, o efeito do comprimento do gene transcrito e o conteúdo GC (MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

Maiores coberturas resultam em maiores quantidades para o total da amostra, o que influencia no número de *reads* mapeadas. O comprimento do transcrito pode causar alterações no ranking de genes diferencialmente expressos, resultando em erros nas análises posteriores (ROBINSON; OSHLACK, 2010). Geralmente, quanto maior o tamanho do genoma de

referência, maior o número de *reads* mapeadas. Estudos propõem diferentes programas que podem ser utilizados para realizar a normalização dos dados podem ser encontrados em diferentes pacotes estatísticos disponíveis para análise (ROBINSON; OSHLACK, 2010).

Para normalização das contagens de leituras das amostras, foi utilizado a função *voom* no *limma* que converte em \log_2 contagens por milhão (logCPM) com pesos de precisão associados. Também podem ser citados outros programas como, DESeq, DEGSeq, edgeR e baySeq implementados no R. Além dos processos de normalização implementados no R, a normalização através do valor de RPKM (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped sequence reads*) é comumente utilizada nas análises de RNA-Seq (LAW et al., 2020).

3.12.4 Análise da expressão gênica diferencial

Na análise de expressão diferencial dos dados provenientes do RNA-Seq, são usados modelos lineares para a determinação do tamanho e as mudanças de direção na expressão gênica. Existem muitos pacotes de softwares estabelecidos para esta finalidade, juntamente com *pipelines* de análise descritos (SMYTH, 2004). Busca-se modelos apropriados para cada tipo de trabalho, podendo ser compreendido as relações da expressão gênica, através das respostas da análise estatística (LAW et al., 2020). Dados genômicos são analisados por meio do *software* R, através dos pacotes contidos no software (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010).

3.12.5 Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos

Nesta etapa é possível concluir os aspectos fenotípicos do organismo estudado, com a anotação funcional dos genes diferencialmente expressos, podendo compreender os mecanismos envolvidos diante da condição em que o organismo/animal estava presente (MUELLER; SCHROEDER, 2004). Esta etapa em geral é realizada por meio de *softwares* (David, Revigo, Panther e Gene ontology), com a transferência dos dados obtidos, comparado ao genoma da espécie estudada (OZSOLAK et al., 2009). Os dados de FDR (*false discovery rate*) e *Log2 fold change* dos genes diferencialmente expressos são contrastados

com os genomas existentes, resultando então nos processos biológicos, quais os genes diferencialmente expressos foram enriquecidos. Com isso torna-se possível por meio da análise de transcritos compreender o perfil de expressão da amostra biológica estudada.

Portanto, a utilização do sequenciamento de RNA possibilitou realizar análises de alto rendimento com o custo menor, além de avaliar o transcriptoma de forma eficiente podendo ser utilizado sozinho ou associado a outros métodos genômicos (CONISA et al, 2016). Os grandes avanços na área genômica e as técnicas moleculares nos permitem compreender de forma mais eficaz o nível dos transcritos em um determinado organismo, podendo compreender o fenótipo e a relação com o genótipo animal.

Portanto, apesar de existirem trabalhos investigando o efeito de Ca e P em poedeiras com idade avançada ainda existe a necessidade de explorar o complexo sistema que coordena a absorção e regulação de Cálcio e Fósforo. Portanto, buscamos identificar por meio da análise de expressão gênica utilizando a técnica de RNA-Seq e qPCR com genes candidatos, novos genes com funções relacionadas com a regulação de Ca e P, para compreender os mecanismos de regulação que ocorrem em poedeiras com idade avançada diante diferentes níveis de Ca e P.

Sendo assim, utilizamos amostras do duodeno e rim de galinhas Bovans White, com 73 semanas de idade, que receberam diferentes níveis de Ca e P na dieta, além disso, buscamos compreender a relação da expressão diferencial com os diferentes níveis de desempenho apresentados, diante dos diferentes níveis de Ca e P fornecidos na dieta. Para isso, utilizamos as amostras do duodeno para realizar o sequenciamento pelo método Illumina, com a técnica de RNA-Seq. E avaliamos a expressão gênica das amostras de rim, utilizando genes candidatos envolvidos nos mecanismos de Cálcio e Fósforo, com a técnica de qPCR.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica de galinhas submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio e fósforo e compreender os mecanismos de homeostasia destes minerais.

Objetivos específicos

- a) Analisar o perfil de expressão gênica dos grupos de poedeiras da linhagem Bovans White com diferentes desempenhos.
- b) Avaliar o perfil da expressão gênica de duodeno de galinhas submetidas a diferentes dietas de Ca e P por meio de análise de RNA-Seq.
- c) Avaliar o perfil da expressão de genes candidatos já descritos como reguladores de cálcio e fósforo no organismo utilizando qPCR.

REFERENCIAS

- ADEDOKUN, S. A.; ADEOLA, O. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 600–608, 2013.
- ALMEIDA PAZ, I. C. L. et al. Efeito do cálcio na qualidade óssea e de ovos de poedeiras. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 222, p. 173–183, 2009.
- AMARAL, G. et al. **Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES**. [s.l: s.n.].
- ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. 10, 2010.
- ARAÚJO, J. et al. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. v.2, n. n.3, p. p.53-60, 2008.
- ARAÚJO, J. A. et al. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2007.
- ARYA, M. et al. **Basic principles of real-time quantitative PCRExpert Review of Molecular Diagnostics**, mar. 2005.
- BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAÚJO, R. P. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 3, p. 309–315, 2007.
- BIAN, Y. et al. Identification of key genes and pathways in post-traumatic stress disorder using microarray analysis. **Frontiers in Psychology**, v. 10, n. FEB, p. 1–10, 2019.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BROWN, J.; PIRRUNG, M.; MCCUE, L. A. FQC Dashboard: Integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. **Bioinformatics**, v. 33, n. 19, p. 3137–3139, 2017.
- BUZINARO, E. F.; DE ALMEIDA, R. N. A.; MAZETO, G. M. F. D. S. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 5, p. 852–861, 2006.
- CARVALHO, D. P. **Qualidade externa de ovos comerciais**. Trabalho de conclusão de curso. **Anais...**2013.
- CARVALHO, L. S. S.; FERNANDES, E. A. Formação e qualidade da casca de

- ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. **Medicina Veterinaria (Brazil)**, v. 7, n. 1, p. 35–44, 2013.
- COSTA, F. et al. Níveis de cálcio em dietas para poedeiras semipesadas após o pico de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. v.37, n. n. 4, p. 624–628, 2008.
- COUTINHO, L. et al. **GENÔMICA ANIMAL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/genomafrango/publica/20062007/Zootec_LuizCoutinho_final2007.pdf>.
- COUTINHO, L. L.; DO ROSÁRIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avancados**, v. 24, n. 70, p. 123–147, 2010.
- DAI, M. et al. NGSQC: Cross-platform quality analysis pipeline for deep sequencing data. **BMC Genomics**, v. 11, n. 4, p. 1–9, 2010.
- ESCOBAR, M. D.; HUNT, J. L. A cost-effective RNA extraction technique from animal cells and tissue using silica columns. **Journal of Biological Methods**, v. 4, n. 2, p. e72, 2017.
- FERNANDES, L. A. Montagem e anotação funcional de sequências gênicas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart . ex DC .) Mattos. p. 1–63, 2015.
- FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**, p. 27–64, 2015.
- FILHO, K. E. **Melhoramento Genético Animal No Brasil: Fundamentos, História E Importância**. [s.l: s.n.].
- FLEIGE, S. et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1601–1613, 2006.
- GARCIA, D. A.; GOMES, D. E. A AVICULTURA BRASILEIRA E OS AVANÇOS NUTRICIONAIS. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, p. 1–16, 2019.
- GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). **J Invest Dermatol**, v. 133(3), n. 6, p. 1–8, 2013.
- GIRARDON, L. F. et al. A Importância do Desenho de Primers. **Review Literature And Arts Of The Americas**, n. March, p. 3–6, 2016.
- GLOUX, A. et al. Possible roles of parathyroid hormone, 1.25(OH)₂D₃, and fibroblast growth factor 23 on genes controlling calcium metabolism across different tissues of the laying hen. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 72, p. 106407, 2020.

- GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: Methodology and application. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 8, p. e11-4, 2013.
- HAAS, B. J.; ZODY, M. C. Advancing RNA-Seq analysis. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 421–423, maio 2010.
- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista científica de Medicina Veterinária**, n. 26, p. 1679–7353, 2017.
- HILLIER, L. W. et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 695–716, 2004.
- KORE, K. B.; PATHAK, A. K.; GADEKAR, Y. P. Nutrigenomics: Emerging face of molecular nutrition to improve animal health and production. **Veterinary World**, v. 1, n. 9, p. 285–286, 2008.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.
- LAW, C. W. et al. A guide to creating design matrices for gene expression experiments. **F1000Research**, v. 9, p. 1–45, 2020.
- LEDUR, M. C. et al. A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. 2002. o conhecimento do genoma para a produção de aves. 2002.
- LEDUR, M.; NONES, K.; ROTA BERTANI, G. **A genômica na produção de Aves: mapeamento de QTLs e genes candidatos**, 2009.
- LICHOVNIKOVA, M. The effect of dietary calcium source, concentration and particle size on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens. **British Poultry Science**, v. 48, n. 1, p. 71–75, 2007.
- LIU, J. B.; CHEN, D. W.; ADEOLA, O. Phosphorus digestibility response of broiler chickens to dietary calcium-to-phosphorus ratios. **Poultry Science**, v. 92, n. 6, p. 1572–1578, 2013.
- MACIEL, J. T. DE L.; BRITO, C. O.; SILVA, C. M. Enzimas exógenas sobre a microbiota intestinal: a expressão de genes e o desempenho de frangos de corte. **Ciência Animal**, v. 30, n. 2, p. 94–108, 2020.
- MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: From technology to biology. **Cellular**

- and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 4, p. 569–579, 2010.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p. 47–51, 2002.
- MESQUITA, R. A. et al. Evaluation of 3 methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA using PCR. **Pesquisa odontológica brasileira = Brazilian oral research**, v. 15, n. 4, p. 314–319, 2001.
- MUELLER, O.; SCHROEDER, A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application. **Nano**, p. 1–8, 2004.
- MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 12, p. 1602–1616, 2005.
- NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. SUPPL. 89, p. 1–13, 2010.
- NASCIMENTO, C. S. et al. Identification of suitable reference genes for real time quantitative polymerase chain reaction assays on Pectoralis major muscle in chicken (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. D. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Rbm**, v. 67, n. November, p. 7–19, 2010.
- NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.
- NUNES, J. K. et al. Com Minerais Orgânicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 610–618, 2013.
- OLIVEIRA, H. F. DE et al. Fatores intrínsecos a poedeiras comerciais que afetam a qualidade físico-química dos ovos. **Pubvet**, v. 14, n. 3, p. 1–11, abr. 2020.
- OLIVEIRA, E. M. M. et al. Desenho de Primers Degenerados através de Bioinformática. **Rio de Janeiro: Embrapa**, p. 3–6, 2015.
- OZSOLAK, F. et al. Direct RNA sequencing. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 814–818, 8 out. 2009.
- PABINGER, S. et al. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR

- (qPCR) data. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 1, n. 1, p. 23–33, 2014.
- PAIVA, A. L. DA C. et al. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 285–288, 2010.
- PARK, S. Y. et al. Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction. **Biological Trace Element Research**, v. 101, n. 2, p. 147–163, 2004.
- PARK, W. et al. RNA-seq analysis of the kidneys of broiler chickens fed diets containing different concentrations of calcium. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- PARKHOMCHUK, D. et al. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 18, 2009.
- PATRICIO, I. S. et al. Overview on the performance of Brazilian broilers (1990 to 2009). **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 14, n. 4, p. 233–238, 2012.
- PAULINO, M. T. F. et al. Criação de frangos de corte e acondicionamento térmico em suas instalações: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 2, p. 1–14, fev. 2019.
- PINTO, S. et al. Cálcio e fósforo na dieta de galinhas de postura: uma revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 1, p. 5–18, 2012.
- PROSZKOWIEC-WEGLARZ, M.; ANGEL, R. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 609–627, 2013.
- ROBERT, J. R. Factors Affecting Egg Internal Quality and Egg Shell Quality in Laying Hens. **Journal of Poultry Science**, v. 41, n. 3, p. 161–177, 2004.
- ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. 1–9, 2010.
- RODRIGUES, J. S. **Bem estar nos sistemas de produção de aves poedeiras**. [s.l: s.n.].
- ROSA, G.; ROCHA, L.; FURLAM, L. Zootec., v.36, suplemento especial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. v.36, p. 185–209, 2007.
- RUTZ, F. et al. **NUTRIGENÔMICA NA PRODUÇÃO DE AVES E SUÍNOS**. [s.l:

s.n.].

SAN, J. et al. Changes in duodenal and nephritic Ca and P absorption in hens during different egg-laying periods. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e06081, 2021.

SCHROEDER, A. et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 1–14, 2006.

SCOTTÁ, B. A. et al. Influência dos minerais quelatados e inorgânicos no metabolismo, desempenho, qualidade da carcaça e da carne de frangos de corte. **Pubvet**, v. 8, n. 9, 2014.

SHI, X. et al. Parallel RNA extraction using magnetic beads and a droplet array. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 4, p. 1059–1065, 2015.

SMYTH, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, 2004.

SOHAIL, S. S.; ROLAND, D. A. Influence of dietary phosphorus on performance of Hy-Line W36 hens. **Poultry Science**, v. 81, n. 1, p. 75–83, 2002.

SORDI, C. Digestibilidade de cálcio e de fósforo de fontes inorgânicas para galinhas poedeiras. p. 72, 2019.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

TAYLOR, S. et al. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S1, 2010.

VAN DIJK, E. L.; JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. **Experimental Cell Research**, v. 322, n. 1, p. 12–20, 2014.

VELLASCO, C. R. et al. Níveis de cálcio e relação cálcio: Fósforo em rações para poedeiras leves de 24 A 40 semanas de idade. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 206–216, 2016.

WANG, Y. et al. Transcriptome analysis on single small yellow follicles reveals that Wnt4 is involved in chicken follicle selection. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2017.

YUAN, J. et al. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping and expression analysis of ADIPOQ(adiponectin) in chicken. **Cytogenetic and**

Genome Research, v. 112, n. 1–2, p. 148–151, 2006.

CAPITULO I

Artigo submetido a Revista PlosOne

CYP24A1 and *TRPC3* gene expression in kidneys and their involvement in calcium and phosphate metabolism in laying hens

Letícia Alves Salmória¹, Adriana Mércia Guaratini Ibelli^{1,2}, Fernando de Castro Tavernari^{2,3}, Jane de Oliveira Peixoto^{1,2}, Marcos Antônio Zanella Morés², Débora Ester Petry Marcelino⁴, Karine Daenquele Silva Pinto⁵, Arlei Coldebella², Diego Surek², Vicky Lilge Kowski², Mônica Corrêa Ledur^{2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brazil.

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brazil.

³Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Chapecó, Santa Catarina, Brazil.

⁴Faculdade de Concórdia, Concórdia, Santa Catarina, Brazil.

⁵Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author

e-mail: monica.ledur@embrapa.br

Abstract

Calcium (Ca) and phosphorus (P) are essential minerals required to animals' health, especially in laying hens since they are essential components for bone structuring and eggshell formation. The main mechanisms of mineral regulation in laying hens are glomerular filtration, tubular reabsorption and tubular secretion in the kidneys. Diets with inadequate levels of Ca and P can interfere with their absorption and digestibility, resulting in eggshell quality losses and reduced productive life, affecting egg production and welfare. Therefore, this study evaluated the expression profile of eight candidate genes in kidney through qPCR analysis and bone integrity traits of laying hens that received different levels of Ca and P in the diet for 50 weeks: a high performance group (HP) containing 4.71% Ca and 0.21% P (22.43 Ca/P ratio), a low performance (LP) with 3.29% Ca and 0.49% P (6.71 Ca/P ratio) and a standard group (STD) with 4% Ca and 0.35% P (11.43 Ca/P ratio). There was no difference in body weight among the three evaluated groups. The humerus and tibia weights were lighter in the HP than in the STD group ($p < 0.05$). The same pattern in humerus was observed when HP was compared to the LP group ($p < 0.05$). *CYP24A1* was upregulated in the STD compared to the LP group, while *TRPC3* was upregulated in the HP compared to the STD group ($p < 0.05$). The expression profile found in *CYP24A1* and *TRPC3* genes could be involved in calcium and phosphate transcellular transport in 73-week-old laying hens and a tentative to keep the mineral absorption in adequate levels to meet the metabolic requirements.

Keywords: mineral, egg quality, qPCR, chickens

Introduction

In laying hens, after the peak of production (from 23rd and 32nd weeks), the egg production and shell quality tend to decrease with age (1,2). Different factors are associated with this process, and the reduction in body mineral absorption is considered one of the most important, especially when inadequate levels of minerals are provided in the diet (3,4). In the young phase, the mineral retention rate is about 60% and with aging the absorption could be reduced up to 40% (5). The calcium (Ca) and phosphorus (P) are considered essential minerals for the bone structure and eggshell formation, and the reduced absorption of Ca and P with aging directly affects these traits (6).

The main mechanisms of mineral regulation in laying hens are glomerular filtration, tubular reabsorption and tubular secretion, which occur in the kidneys (7). These organs are fundamental for homeostasis, adjusting the Ca and P amounts retained, and modulating the absorption and reabsorption in the nephrons (8,9). Furthermore, the kidneys have a key role in the production of the vitamin D bioactive form (10).

The intestine and bones simultaneously participate in the mineral regulatory process through hormonal regulators, such as parathyroid hormone (PTH), estrogen, calcitonin, vitamin D, *FGF23* (Fibroblast growth factor 23), and membrane receptors (11,12)(11). Furthermore, the involvement of cytokines and inflammatory mediators with mineral homeostasis have also been described (12).

In the last years, there is an increase in studies trying to understand the

impact of different diets in gene expression profile and their associated metabolic pathways (13–15). Moreover, several studies have been carried out evaluating different mineral levels and their influence on bone composition and production traits in broilers and in young laying hens using gene expression analysis (16,17). However, the mechanisms of absorption, reabsorption and mineral homeostasis of laying hens with advancing age are not well known. Therefore, in this study, bone traits and the expression of eight candidate genes in the kidney were evaluated in 73-week-old laying hens submitted to different levels of Ca and P in the diet to understand their influence in the homeostasis mechanism.

Material and methods

Animals and sample collection

This study followed the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA) and Ethics Committee for Animal Use (CEUA) from the Embrapa Swine and Poultry National Research Center, with approval protocol #017/2016. This study was carried out with commercial Bovans White laying hens up to 73 weeks of age in a randomized block design with a total of nine treatments with 10 replicates of 7 birds per cage, totaling 630 hens. Diets with various Ca and P levels (Table 1) were formulated according to Rostagno et al. (2017) and the calcium granulometry used for feed composition was 50% fine and 50% coarse. A standard diet (Rostagno et al., 2017) was given to the hens during the first 20 weeks of age and from 21 to 73 weeks of age they received the experimental diet (Table 1), totaling 52 weeks of experiment.

Table 1. Different levels of calcium and phosphorus provided for the laying hens.

Treatment	Ca, %	P disp, %	Ca/P disp, %
1	4.71	0.49	9.61
2	4.71	0.21	22.43
3	3.29	0.49	6.71
4	3.29	0.21	15.67
5	4.00	0.35	11.43
6	5.00	0.35	14.29
7	3.00	0.35	8.57
8	4.00	0.55	7.27
9	4.00	0.15	26.67

From a total of nine experimental groups, three were chosen for gene expression analysis based on a previous performance and quality trait analysis (Supplementary Table 1): a high performance group (HP) containing 4.71% Ca and 0.21% P (22.43 Ca/P ratio), a low performance (LP) with 3.29% Ca and 0.49% P (6.71 Ca/P ratio) and a standard group (STD) with 4% Ca and 0.35% P (11.43 Ca/P ratio). The STD diet consisted of approximated levels of Ca and P commonly provided for laying hens. At 73 weeks of age, 30 chickens (10/group) were sampled and transferred to the necropsy facility at the Embrapa Swine and Poultry National Research Center where they were sacrificed by cervical dislocation for kidneys, humerus and tibia sample collection. Kidney samples were immediately stored in liquid nitrogen and subsequently kept at -70°C for gene expression analysis, and for histological analysis, they were stored in 4% paraformaldehyde. Bones were cleaned and stored at -20°C for physical-chemical analysis.

Kidneys histological analysis

Samples were dehydrated in crescent ethanol concentration, diaphanized with xylol and then embedded in paraffin. Sections of the tissues were performed in an automatic microtome with 2 to 5 μm thickness and stained with hematoxylin and eosin protocol. Slides were visualized by light microscopy in an Olympus BX53 (Olympus, Japan) microscope with a 10x eyepiece and 5x to 50x objectives for routine histopathological analysis. Images corresponding to the samples of the three studied groups were captured by microscope camera (AXIO Scope AI) in the 20x and 50x objectives.

Physical-chemical analysis of tibia and humerus

The tibia and humerus were weighed in a precision scale and the length was measured with a paquimeter and they were stored at -20°C . Bones were unfrozen and kept at 4°C for 24 hours, when they were dissected for femur integrity-related traits evaluation: breaking strength (BS, kgf) and flexibility (FLEX, kgf/mm). The bone resistance analyses were performed in the texturometer TA–XTPlus Texture Analyzer Texture Technologies Corporation, using the 3-Point Bending Rig (HDP/M3PB) with 5 kg load cell Heavy Duty Platform (HDP/90), according to Cruz et al. (2015). Bones were positioned with their epiphyses resting on two supports spaced 40 mm. The BS is the maximum stress that the bone can withstand while being stretched before breaking and the FLEX is the ratio between BS and the bone elastic linear displacement. The Seedor Index (SI) was calculated by the ratio between tibia weight and length (19). To verify the differences among groups, an ANOVA was performed and the Tukey test was used for group comparison considering significant if $p \leq 0.05$ using the R software (20).

RNA extraction, quantification, and complementary

DNA (cDNA) synthesis

A total of 100 mg of kidney samples was macerated in liquid nitrogen and the total RNA extraction was performed using Trizol reagent (Life Technologies, USA), according to the manufacturer's instructions, followed by purification on a silica column with Qiagen RNEasy kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). RNA concentration was measured with the Biodrop device (Biodrop, UK) using 1 μ L of each sample and A260/A280 ratio was used to assess RNA purity, which was considered adequate in the range of 1.9 to 2.1.

The cDNA synthesis was performed with the GoScript Reverse Transcriptase kit (Promega, WI, USA) using 3 μ g of total RNA, following the manufacturer's recommendations for poly-A selection. The cDNA was diluted in 1:10 and stored at -20 C for subsequent qPCR analyses.

Reference gene selection

A set of 10 candidate reference genes was evaluated according to their stability to be used as normalizer in the gene expression analysis in the kidney tissue:

GAPDH (Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase), HMBS

(Hydroxymethylbilane Synthase), *HPRT1* (Hypoxanthine

Phosphoribosyltransferase 1), *MRPS27* (Mitochondrial Ribosomal Protein S27),

MRPS30 (Mitochondrial Ribosomal Protein S30), *RPL30* (Ribosomal Protein

L30), *RPL4* (Ribosomal Protein L4), *RPL5* (Ribosomal Protein L5), *RPLP1*

(Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P1) and *TOP2B* (DNA Topoisomerase

II) (Table 2). The qPCR reactions were performed using the following protocol: 1X GoTaq qPCR Master Mix (Promega, WI, USA), 0.133 uM forward primer, 0.133 uM reverse primer, cDNA in 1:10 dilution and ultra-pure water (Promega, WI, USA) up to 15 µL of final volume. All reactions were performed in duplicate, using negative controls to detect possible contamination, in the QuantStudio 6 Real-Time PCR equipment (Life Technologies, CA, USA). Cycling conditions were 95° for 2 min, 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 30 seconds 60 ° C and a melting curve analysis step was added following the manufacturer protocol. The cycle threshold (Ct), standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were obtained for each sample. Ct means were used to assess the gene stability performed with the automated pipeline endoGenes (<https://hanielcedraz.shinyapps.io/endoGenes/>). This pipeline uses the three most known programs to evaluate gene stability: geNorm (21), NormFinder (22) and BestKeeper (23), generating a final ranking in RankAgree package (24) with the most stable genes. The *RPL5* and *RPL30* were selected as the most stable genes found for kidney tissues (Supplementary Table 2).

Table 2. Primers for the reference candidate genes evaluated in kidneys of laying hens.

Gene	Gene ID	Primers (5'-3')
<i>RPL30</i> ¹ (ribosomal protein L30)	ENSGALG00000029897	F: 5'- ATGATTCGGCAAGGCAAAGC-3' R: 5'- GTCAGAGTCACCTGGGTCAA-3'
<i>RPL4</i> ¹ (ribosomal protein L4)	ENSGALG00000174444	F: 5'- TGTTTGCCCAACCAAGACT-3' R: 5'- CTCCTCAATGCGGTGACCTT-3
<i>HBMS</i> ² (Hydroxymethylbilane synthase)	ENSGALG00000042939	F: 5'- ACTAGTTCACCTTCGGCGAGC-3' R: 5'- CTCAGGAGCTGACCTATGCG-3'
<i>GAPDH</i> ³ (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	ENSGALG00000014442	F: 5'-TGGGAAGCTTACTGGAATGG-3' R:ATCAGCAGCAGCCTTCACTAC-3'
<i>MRPS30</i> ⁴ (Mitochondrial ribosomal protein S30)	ENSGALG00000014874	F: 5'-CCTGAATCCCGAGGTTAACTATT-3' R: GAGGTGCGGCTTATCATCTATC-3'

<i>MRPS27</i> ⁴ (mitochondrial ribosomal protein S27)	ENSGALG00000015002	F: 5'- GCTCCCAGCTCTATGGTTATG-3' R: 5'-ATCACCTGCAAGGCTCTATTT-3'
<i>HPRT1</i> ³ (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)	ENSGALG000000006098	F: 5'-TGGGGATGACCTCTCAACCT-3' R: 5'-TCCAACAAAGTCTGGCCGAT-3'
<i>RPLP1</i> ³ (ribosomal protein lateral stalk subunit P1)	ENSGALG00000030878	F: 5'-CCCTCATTCTCCACGACGACZ-3' R: 5'-CCAGAGCCTTAGCAAAGAGAC-3'
<i>RPL5</i> ⁴ (ribosomal protein L5)	ENSGALG00000005922	F: 5'-AATATAACGCCTGATGGGATGG-3' R: 5'-CTTGACTTCTCTCTTGGGTTTCT-3'
<i>TOP2B</i> ⁵ (DNA Topoisomerase II Beta)	NM_205082.1	F: 5'AAGGCCAAGAAGATGGAAACTG3' R:5'TCTTGGATTTCTTGCATGGTGT3'

¹Petry et al. (2018) (25), ²Paludo et al. (2016)(26), ³ Marciano et al. (2020)(27), ⁴Nascimento et al. (2015), ⁵Okino et al. (2015)(28)

Primer design of target genes and gene expression analysis

Eight candidate genes were chosen according to previous studies reporting their functions associated with calcium and phosphorus homeostasis (29–33) for qPCR analysis. Primers for *CYP24A1* (cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1), *FGF3R* (member of the basic fibroblast growth factor), *PTH* (parathyroid hormone), *TRPV6* (transient receptor potential cation channel subfamily V member 6), *CALB1* (calbindin 1), *CALM2* (calmodulin 2), *FGF1* (fibroblast growth factor 1) and *TRPC3* (transient receptor potential cation channel subfamily C member 3) were designed (Table 3). For the design of the primers, searches were carried out through the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), and the searches for the complete genome were carried out in Ensembl (ensembl.org/index.html). To compare the sequences found, we used the PRIMER BLAST program (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). For the qPCR reactions, 1X of Master MIX SYBR Green 2X, 0.133 uM of Forward primer,

0.133 μ M of Reverse 2 μ M primer, cDNA in 1:10 dilution and ultra-pure water (Nuclease Free Water, Qiagen) were used. qPCR reactions were performed in duplicate in 15 μ L of final volume. Subsequently, qPCRs reactions were submitted to the QuantStudio 6 Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction conditions to assess the specificities of the amplification were: 95°C for 2 min, 40 cycles for 15 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. The expression level of target genes was determined using cycle threshold (Ct) values and changes in gene expression were calculated with the $2^{-\Delta C_t}$ method (34), using the geometric mean of the endogenous genes *RPL5* and *RPL30*. Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis, followed by the pos-hoc Dunns test in the R environment. Genes were considered differentially expressed (DE) among the studied groups if the p-value was ≤ 0.05 .

Table 3. Primers for the target genes evaluated in kidneys of laying hens.

Gene	Primers Sequence (5'-3')	Ensembl ID
<i>CYP24A1</i> (Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1)	F: 5'-GCCCTGTGCTGGATCATTCG-3' R: 5'-GCCGTCATTAGTCAAGCTGC-3'	ENSGAL0000042279
<i>FGFR3</i> (Member of the basic fibroblast growth factor)	F: 5'-CCACTCAAGAGACAGGTAACAGTG-3' R: 5'-CCCAGGGTCAGGCGAGAA-3'	ENSGAL0000015708
<i>PTH</i> (Parathyroid hormone)	F: 5'-CCATCTGCTGACATACCCCAA-3' R: 5'-TCACTCACCGATCTCTTCATCATTG-3'	ENSGAL0000061928.2
<i>TRPV6</i> (transient receptor potential cation channel subfamily V member 6)	F: 5'-TGGAGAGCCCAGATTGTTGC-3' R: 5'- ATACCATCGGTCCCCTAGCC-3'	ENSGAL0000014746
<i>FGF11</i> (Fibroblast growth factor 1)	F: 5'- CTGTATGGCTCGCAGCTACC-3' R: 5'- CTGTTCCCGTTTTTCTTCAGCC -3'	ENSGALG00000007343
<i>TRPC3</i>	F: 5'- CGTGTAGCAGGCTTGGAAGA-3'	ENSGALG0000011875

(Transient receptor potential cation channel subfamily C member 3)	R: 5'- TTTTCCTAGGCCTGCTGGTG-3'	
<i>CALB1</i> ²	F: 5'-GGCAGGCTTGGACTTAACAC-3'	ENSGALG0000
	R: 5'-GCTGCTGGCACCTAAAGAAC-3'	0015914
(Calbindin 1)		
<i>CALM2</i> ²	F: 5'-CCACCATGGCTGATCAACTG-3'	ENSGALG0000
(Calmodulin 2)	R: 5'-GCCATTGCCATCAGCGTCTA-3'	0010023

¹Marchesi et al. (2021)(35), ²Paludo et al. (2017)(26)

Results

Kidney histopathological analysis

No alterations in the kidney microscopic evaluation were observed in the HP group (Fig 1A and 1B). In the other two groups, the presence of lymphocytic inflammatory infiltration was observed in 20% of the samples from STD group (Fig 1C and 1D) and 40% of the samples from LP group, respectively (Fig1E and 1F).

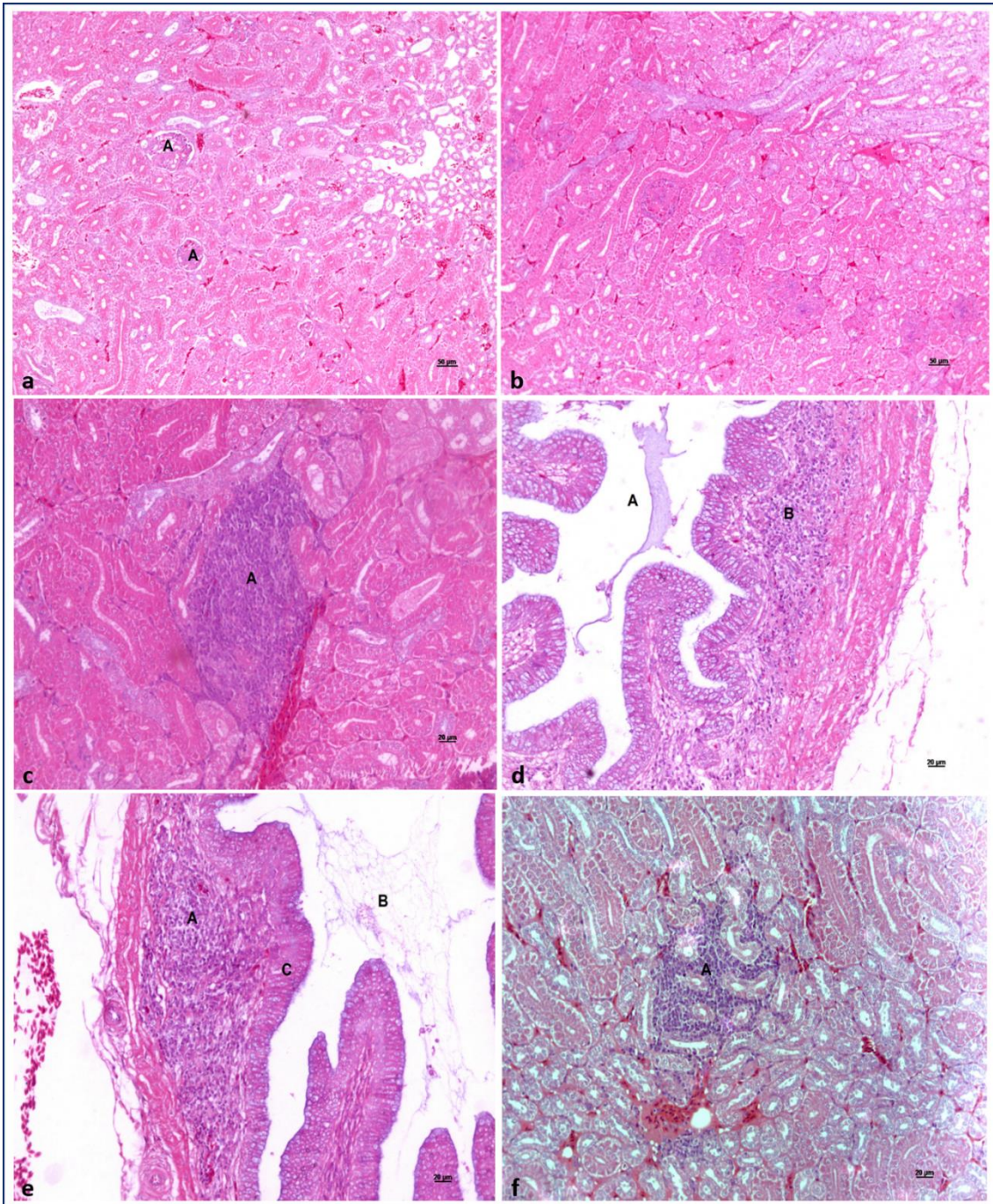


Figure 3. Histopathological slide stained with hematoxylin and eosin (HE).

a and b) Nephrons and glomeruli visualization. Normal histology, with no histopathological changes. c) Mild lymphocytic interstitial infiltration (A). d) (A) Collecting tubule lumen. (B) Presence of lymphocytic infiltrate in the collecting tubule mucosa. e) (A) Lymphocytic infiltration in the collecting tubule mucosa (B) Collecting tubule lumen (C) Collecting tubule epithelial cells. f) (A) Mild interstitial lymphocytic infiltration in the renal cortex

Physical-chemical analysis of tibia and humerus

There was no difference in the body weight at 73 weeks of age among the three groups ($p > 0.05$, Table 4). Considering the morphometric analyses, the humerus and tibia weights were lighter in the HP than in the STD group ($p < 0.05$, Table 4). The same pattern was observed in humerus when the HP was compared to the LP group ($p < 0.05$, Table 4). For the other analyzed traits, no differences were observed among groups (Table 4).

Table 4. Means and standard errors of phenotypic traits evaluated in tibia and humerus bones from laying hens.

Traits	Groups		
	HP	LP	STD
Body weight (g)	1856.9 ± 72,40	1702.4 ±	1827.8 ± 55.58
Tibia weight (g)	8.01 ± 0.14 ^a	8.26 ± 0.07 ^{ab}	8.66 ± 0.19 ^b
Tibia length (mm)	116.88 ± 1.17	116.76 ± 0.36	117.34 ± 0.84
Tibia BS (kgf)	14.58 ± 0.91	16.08 ± 0.46	17.67 ± 1.15
Tibia FLEX (kgf/mm)	13.39 ± 1.25	11.80 ± 0.99	13.33 ± 0.81
Seedor index (mg/mm)	0.073 ± 0.003	0.071 ± 0.001	0.075 ± 0.002
Humerus weight (g)	2.87 ± 0.07 ^a	3.38 ± 0.13 ^b	3.26 ± 0.05 ^b
Humerus length (mm)	74.12 ± 0.49	74.06 ± 0.28	75.47 ± 0.58

HP: high performance; LP: low performance; STD: standard diet
BS: Breaking strenght; FLEX: flexibility

Gene expression analysis

All the evaluated genes were expressed in the kidney tissue, and the Cts varied from 15.65 to 37.39. From the eight target genes analyzed, two of them were DE between groups. The *CYP24A1* was upregulated about 3-fold ($p \text{ adj.} < 0.05$) in the STD compared to the LP group (Figure 2) and the *TRPC3* was about 4 times more expressed in the HP than in the STD group ($p \text{ adj.} < 0.05$).

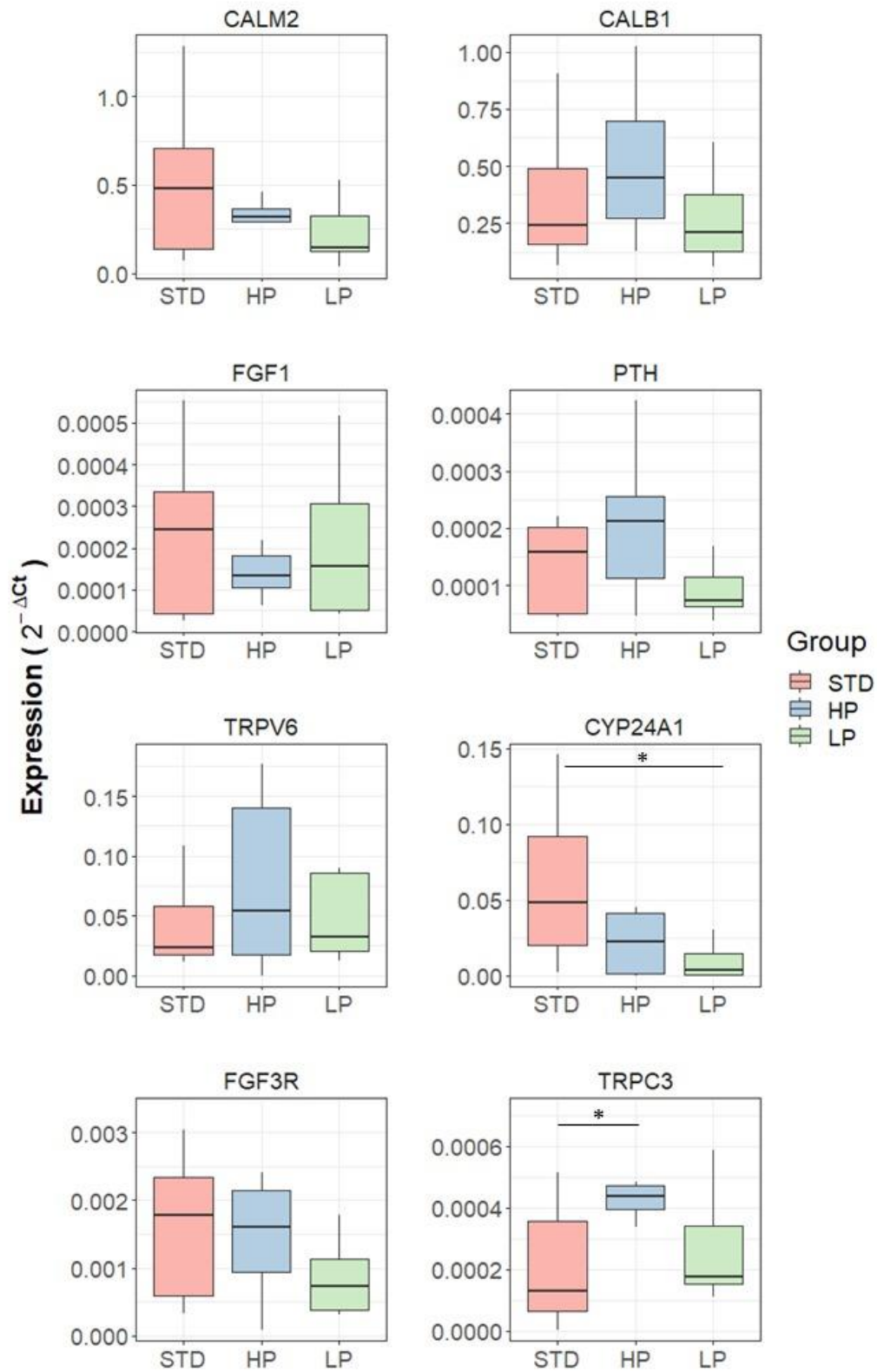


Figure 4. Relative expression performed in kidney of 73-week-old laying hens. *p<0.05

Discussion

Ca and P are key minerals that affect the performance and the egg quality of laying hens (36), and their utilization is reduced with advancing age (37).

Therefore, eight candidate genes that encode Ca and P transporters and their regulators were evaluated to understand and explore their effects in kidney gene expression of laying hens at their late phase of production, which received different levels of Ca and P in the diet. This tissue was used since it is considered the main functional organ in the reabsorption of minerals (38).

Additionally, for gene expression analysis, some bone traits were also evaluated in tibia and humerus. Their humerus weight were slightly lighter for the HP group than for the other groups in (Table 3). Ca and P levels in the diet are essential to bone mineralization (39–41) and health (42). Although there was a variation in the bone weights, there was no variation in BS, FLEX and SI. These results indicate that the bone quality traits evaluated in our study were not affected by the different Ca/P ratio provided in the diet among groups.

Similar results were found by Adhikari et al. (2020) (43), who evaluated different Ca and P diets and vitamin D supplementation in 57-week-old laying hens and did not observe their influence in tibia and femur phenotypic traits. In a study with 42-day-old broilers receiving different formulations of Ca and non-phytate P in the diet, the results of tibia bone strength were similar between the different groups (44).

In our study, two genes (*TRPC3* and *CYP24A1*) were DE in the kidney of laying hens according to the Ca/P ratio in the diet. The *TRPC3* gene encodes a protein that acts mainly in the formation of non-selective calcium channel and other ions and are activated in response to calcium and influx signaling (45).

The *TRPC3* can be activated by the renin-angiotensin system and the amount of fluid within blood vessels to control blood pressure (46). In humans, *TRPC3* was upregulated in kidneys of patients with hypertension (47). Studies carried out in rat fibroblasts found that changes in calcium dynamics coincide with the *TRPC3* expression of calcium channel activity, which is essential to calcium homeostasis (48–50). Furthermore, some members of the TRPC family in calcium channels of cell membrane are activated by the calcium store depletion mechanism (49,50).

The *TRPC3* gene was upregulated in the HP when compared to STD group. Studies have found that the existence of a coupled luminal membrane in the kidneys proximal tubules (Tb) is dependent of the *TRPC3* expression. These tubules are located in the Henle loop, which are considered sites of high calcium absorption (51). Furthermore, in a comparative study, *TRPC3*-depleted in mice showed deficiency in Tb calcium entry and transport (52). The signaling in the Tb region indicates that TRPC3 protein is involved in transcellular transport of calcium through Tb (53). In this way, the upregulation of *TRPC3* in the HP group may indicate the existing transcellular activity in the epithelial calcium transport in laying hens at their late phase of production. This could be occurring because the HP group received the highest level of Ca in the diet, and consequently, activating the active transport of Ca.

The *CYP24A1* gene encodes a member of cytochrome family having a role in the Ca and Vitamin D homeostasis by promoting vitamin D catabolism and reducing the circulating 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 α ,25-(OH)₂ D₃ (54). In our study, *CYP24A1* was approximately 2.5 times more expressed in the STD group than in the LP group. In humans, mutations in this gene have been

associated to hypercalcemia, hypercalciuria, hypophosphatemia (55) and with idiopathic infantile hypercalcemia (56). In laying hens, some studies evaluated the *CYP24A1* gene to verify its role in osteogenesis (57) and in the regulation of serum vitamin D (32,58). Gloux et al. (32) observed that kidney *CYP24A1* upregulation occurred earlier in old than in young hens at 18-19 hours post ovulation, attributing this result with the need to stimulate Ca retention and bone resorption. In our study, the groups with high Ca levels (STD and HP) did not differ in the *CYP24A1* expression, having similar results in eggshell percentage as well (Supplementary Table 1). Therefore, high levels of Ca in the diet could help to control Ca in the cells through compensatory mechanisms and active transport.

For the other genes evaluated, *PTH*, *CALB1*, *FGF3R*, *FGF1* and *CALM2*, no differential expression was observed among groups. The parathyroid hormone (*PTH*) gene is considered a central mediator in hormone regulation and one of the most studied genes in cell mineral regulation (41,59,60). When low levels of Ca and P are provided in the diet, *PTH* is stimulated and trigger bone activity and mineral absorption in the intestinal lumen (9,61,62). This gene activates *CYP27B1* expression increasing the 1α -hydroxylase enzyme in the kidneys (proximal renal tubule), and converting vitamin D, 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)₂D₃), into 1,25 (OH)₂ D₃ 1,25-dihydroxycholecalciferol, which helps intestinal Ca absorption and then reducing the Ca in blood (62,63). Thus, *PTH* becomes an active hormone, having a role in mineral metabolism (60,64). In our study, the *PTH* gene was not DE between any of the evaluated groups. Although Ca and P levels available were very different in the diets, the *PTH* expression was not influenced by these diets, possibly because none of the

levels provided were considered deficient in Ca and P.

The *CALB1* gene, one of the main genes participating in calcium absorption (32,65), acts mainly on epithelia, being efficient in signal transmission induced by Ca^{2+} (66). Present in cell cytosol at the distal part of the nephron, *CALB1* is involved in the Ca^{2+} diffusion from apical inflow sites to the basolateral flow (67,68). This gene is activated when vitamin D concentrations increases, triggering bone matrix degradation for higher mineral absorption (60,65). *CALB1* is also more expressed when vitamin D levels are elevated, Li et al. (2012) (69) reported that *CALB1* gene had a positive regulation when there was a low mineral presence in the diet, increasing the intracellular diffusion of minerals. The non-differential expression of *CALB1* gene in our results could also be explained because of diet adaptation since the animals received the same feed for a long time, indicating a compensation mechanism to maintain calcium absorption (70).

The *TRPV6* gene, an ion channel encoder that acts on epithelial absorption, has already been found expressed in intestine and kidneys (10,71). This gene stands out for its high selectivity of calcium in relation to other ions, and it is found mainly in the apical membrane in epithelial tissues that transport calcium (72,73). In kidneys, this gene has a main role in mineral renal reabsorption (12). *TRPV6* was not DE in laying hens in their late phase of production, which indicates that renal reabsorption regulation among the studied groups did not differ according to the different levels of Ca and P provided in the diet.

As previously mentioned, in order to trigger mineral absorption in the intestine and kidneys, vitamin D hydroxylation is necessary, first occurring in

liver and resulting in $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ formation and second, its hydroxylation, considered one of the most important steps resulting in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, active form in kidneys, facilitated by 1α -hydroxylase enzyme (74). This mechanism is dependent on Ca and P concentrations in the diet. Therefore, when high levels of those minerals are provided, the action of *CALM2* occurs, which encodes its protein, releasing the hormone secreted by the parafollicular cells, which acts inversely to PTH, increasing the renal excretion of calcium and phosphate (75). Here, *CALM2* was not DE between any studied groups, so the diets provided have adequate levels of these minerals.

The fibroblastic growth factor (FGF) gene family is involved in a series of cell function, including mineral metabolism. One of the most studied genes of this family is the *FGF23*, which encodes a bone-derived phosphaturic hormone, acting mainly in the kidney, increasing renal excretion in cases of hyperphosphatemia and hypercalcemia, and in the PTH reduction through the suppression of hydroxylase in the kidney (76). The involvement of some other genes, such as *FGF1* and *FGF3R*, on mineral metabolism has been investigated. These genes have already been associated with bone diseases in humans, such as achondroplasia and hypochondroplasia (77,78). *FGF1* has already been associated with mitogenic activity in kidney (79). In mice, its expression inhibit oxidative stress and inflammation (80). *FGF1* has several functions related to mineral homeostasis, especially those related to hypertension and oxidative stress (81). Diets with high mineral concentration can cause oxidative stress leading to hypertension (81,82). In our study, *FGF1* gene was not DE between any of the groups, possibly because the different diets did not lead to any stress condition.

Several factors can influence the mineral metabolism related to phenotypic traits of laying hens, such as mineral granulometry, time of mineral absorption by the intestine, mineral source (organic or inorganic), intestinal pH, among others (83–86). In the last years, it has been demonstrated that an increase in calcium granulometry led to a better mineral use by the animals, which has become a favorable alternative in poultry production (87), since it has been shown an improvement in eggshell quality traits (80,88). In addition to these approaches, studies using molecular biology have been conducted to help the understanding of mineral metabolism in laying hens, especially comparing the levels of gene expression among different ages (6,13,89,90). However, there is a lack of information on how hens in late laying period respond to different levels of Ca and P in the diet. Therefore, in our study, groups with various Ca and P levels with different performances were evaluated in 73-week-old laying hens, and found two candidate genes (*CYP24A1* and *TRPC3*) DE between groups. It seems that the expression profile found could be involved with calcium and phosphate transcellular transport in laying hens at their late phase of production and a tentative to keep the mineral absorption in adequate levels to meet the metabolic requirements, as suggested by Vargas et al. (91). Furthermore, despite the differences in mineral levels, the expression of important functional genes, such as *CALB1* and *CALM2* kept unchanged, indicating the existence of mechanisms of compensation and adaptation to mineral utilization in chickens. This could help to mediate the poultry health, mainly through mechanisms of the long-term adaptive capacity, as has been suggested in broilers (70). In laying hens, these mechanisms are not well described, but could be one of the explanations for the small variation in bone

traits, as well as for performance traits evaluated in this population. Therefore, these adaptation mechanisms and their effects should be better explored in order to improve poultry production and welfare.

Conclusion

The *CYP24A1* and *TRPC3* genes were differentially expressed between 73-week-old laying hens receiving different Ca and P levels in the diet. The expression profile found could be involved with calcium and phosphate transcellular transport in laying hens at their late phase of production and a tentative to keep the mineral absorption in adequate levels to meet the metabolic requirements.

Acknowledgments

LAS was sponsored by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) scholarship. MCL and FCT are recipients of a productivity fellowship from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq). DEPM was recipient of a PIBIC/CNPq scholarship at the Embrapa Swine and Poultry National Research Center. We thank CAPES (Brazil – Finance Code 001) for the free access to the journals used in the literature review. The authors are grateful to Alexandre L. Tessmann for technical assistance.

Funding

This study was funded by project #13.16.04.05.00.00 from the Brazilian

Agricultural Research Corporation (Embrapa) - Brazilian Government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiment: JOP MCL FCT.

Performed the experiment: LAS AMGI DEPM JOP MCL MAZN KDSP DS VLK

Data analysis and curation: LAS AMGI JOP MCL AC FCT

Writing – Original Draft preparation: LAS AMGI JOP MCL FCT

Writing – Review and Editing: LAS AMGI JOP MCL FCT AC MAZN KDSP DS
VLK

Funding Acquisition: FCT JOP

Supervision of the research: AMGI FCT

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Ergin O, Isa C, Nuh O, Guray E. Effects of dietary humic substances on egg production and egg shell quality of hens after peak laying period. *African J Biotechnol.* 2009;8(6):1155–9.
2. Bain MM, Nys Y, Dunn IC. Increasing persistency in lay and stabilising egg quality in longer laying cycles. What are the challenges? *Br Poult Sci* [Internet]. 2016;57(3):330–8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2016.1161727>

3. Alves SP, Da Silva IJO, Piedade SMDS. Laying hens welfare evaluation: Effects of rearing system and bioclimatic environment on performance and egg quality. *Rev Bras Zootec.* 2007;36(5):1388–94.
4. Araújo J, Silva J, Amâncio AL, Lima CB, Oliveira E. Fontes de minerais para poedeiras. *Acta Vet Bras.* 2008;v.2(n.3):p.53-60.
5. Oliveira HF de, Carvalho DP, Ismar MG, Rezende PM, Camargo SMP, Souto CN, et al. Fatores intrínsecos a poedeiras comerciais que afetam a qualidade físico-química dos ovos. *Pubvet.* 2020 Apr;14(3):1–11.
6. Proszkowiec-Weglarz M, Angel R. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J Appl Poult Res [Internet].* 2013;22(3):609–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2012-00743>
7. Wideman RF. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J Nutr.* 1987;117(4):808–15.
8. Chang W, Tu C, Chen T-H, Bikle D, Shoback D. The Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Is a Critical Modulator of Skeletal Development. *Sci Signal.* 2013;1(35):1–23.
9. Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: Concerted interplay of new regulators. *Ann Med.* 2008;40(2):82–91.
10. Jeon US. Kidney and calcium homeostasis. *Electrolyte Blood Press.* 2008;6(2):68–76.
11. Gutowska MS, Parkhurst RT. Studies in Mineral Nutrition of Laying Hens. *Poult Sci [Internet].* 1942;21(4):321–8. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0210321>
12. Linda ADM, Imel EA. Calcium and Phosphate: Hormonal Regulation and Metabolism [Internet]. Second Edi. Basic and Applied Bone Biology. Elsevier Inc.; 2019. 257–282 p. Available from:
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00013-0>
 13. Reyer H, Oster M, Ponsuksili S, Trakooljul N, Omotoso AO, Iqbal MA, et al. Transcriptional responses in jejunum of two layer chicken strains following variations in dietary calcium and phosphorus levels. *BMC Genomics*. 2021;22(1):1–12.
 14. Wang X, Li P, Zhao J, Jiao H, Lin H. The temporal gene expression profiles of calcium and phosphorus transporters in Hy-Line Brown layers. *Poult Sci* [Internet]. 2022;101736. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101736>
 15. Jing M, Zhao S, Rogiewicz A, Slominski BA, House JD. Assessment of the minimal available phosphorus needs of laying hens: Implications for phosphorus management strategies. *Poult Sci* [Internet]. 2018;97(7):2400–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey057>
 16. Park W, Rengaraj D, Kil DY, Kim H, Lee HK, Song KD. RNA-seq analysis of the kidneys of broiler chickens fed diets containing different concentrations of calcium. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11379-7>
 17. Li Q, Zhao X, Wang S, Zhou Z. Letrozole induced low estrogen levels affected the expressions of duodenal and renal calcium-processing gene in laying hens. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2018;255:49–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.10.005>

18. Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res.* 2009 Dec;6(4):339–46.
19. Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. (mk.-217). 1991;6(4):340–6.
20. Konietzschke F, Placzek M, Schaarschmidt F, Hothorn LA. nparcomp: An R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. *J Stat Softw.* 2015;64(9):1–17.
21. Vandesompele J, Preter K De, Pattyn F, Popper B, Roy N Van, Paepe A De, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;51(9):2747–59.
22. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245–50.
23. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26(6):509–15.
24. Pihur V, Datta S, Datta S. Weighted rank aggregation of cluster validation measures: A Monte Carlo cross-entropy approach. *Bioinformatics.* 2007;23(13):1607–15.
25. Petry B, Savoldi IR, Ibelli AMG, Paludo E, de Oliveira Peixoto J, Jaenisch FRF, et al. New genes involved in the Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis in commercial broilers. *Livest Sci [Internet].* 2018;208:33–9.

- Available from: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.12.003>
26. Paludo E, Ibelli AMG, Peixoto JO, Tavernari FC, Lima-Rosa CAV, Pandolfi JRC, et al. The involvement of RUNX2 and SPARC genes in the bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers. *Animal*. 2017;11(6):1063–70.
 27. Marciano CMM, Ibelli AMG, Peixoto J de O, Savoldi IR, do Carmo KB, Fernandes LT, et al. Stable reference genes for expression studies in breast muscle of normal and white striping-affected chickens. *Mol Biol Rep [Internet]*. 2020;47(1):45–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05103-z>
 28. Okino CH, Ibelli AMG, Brentano L, Zanella R, Groke Marques M. Evaluation of candidate reference genes for investigation of the uterine tissue and corpus luteum of pigs on day 6 after artificial insemination. *Anim Reprod Sci [Internet]*. 2018;198(September):202–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.020>
 29. Yang JH, Zhao ZH, Hou JF, Zhou ZL, Deng YF, Dai JJ. Expression of TRPV6 and CaBP-D28k in the egg shell gland (uterus) during the oviposition cycle of the laying hen. *Br Poult Sci*. 2013;54(3):398–406.
 30. Fan Y, Bi R, Densmore MJ, Sato T, Kobayashi T, Yuan Q, et al. Parathyroid hormone 1 receptor is essential to induce FGF23 production and maintain systemic mineral ion homeostasis. *FASEB J*. 2016;30(1):428–40.
 31. Li X, Zhang D, Bryden WL. Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry: Are current diets formulated in excess? *Anim Prod Sci*. 2017;57(11):2304–10.

32. Gloux A, Le Roy N, Ezagal J, Môme N, Hennequet-Antier C, Piletty ML, et al. Possible roles of parathyroid hormone, 1.25(OH)₂D₃, and fibroblast growth factor 23 on genes controlling calcium metabolism across different tissues of the laying hen. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2020;72:106407. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106407>
33. Mishra SK, Chen B, Zhu Q, Xu Z, Ning C, Yin H, et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with high rates of egg production in chicken hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8.
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
35. Marchesi JAP, Ono RK, Cantão ME, Ibelli AMG, Peixoto J de O, Moreira GCM, et al. Exploring the genetic architecture of feed efficiency traits in chickens. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84125-9>
36. Li P, Wang R, Jiao H, Wang X, Zhao J, Lin H. Effects of dietary phosphorus level on the expression of calcium and phosphorus transporters in laying hens. *Front Physiol*. 2018;9(MAY):1–12.
37. Hayam AAE-M, EL-Khateeb AY, Al-Khalaifah H, El-Sayed ESA, Hamed S, El-Said EA, et al. Effects of ecofriendly synthesized calcium nanoparticles with biocompatible *Sargassum latifolium* algae extract supplementation on egg quality and scanning electron microscopy images of the eggshell of aged laying hens. *Poult Sci* [Internet]. 2021;100(2):675–

84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.043>
38. Brown AJ, Krits I, Armbrrecht HJ. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch Biochem Biophys*. 2005;437(1):51–8.
39. Williams B, Waddington D, Solomon S, Farquharson C. Dietary effects on bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens. *Res Vet Sci*. 2000;69(1):81–7.
40. Regassa A, Adhikari R, Nyachoti CM, Kim WK. Effects of 25-(OH)D₃ on fecal Ca and P excretion, bone mineralization, Ca and P transporter mRNA expression and performance in growing female pigs. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes*. 2015;50(4):293–9.
41. Zhang LH, He TF, Hu JX, Li M, Piao XS. Effects of normal and low calcium and phosphorus levels and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on performance, serum antioxidant status, meat quality, and bone properties of broilers. *Poult Sci*. 2020;99(11):5663–72.
42. Driver JP, Pesti GM, Bakalli RI, Edwards HM. Effects of calcium and nonphytate phosphorus concentrations on phytase efficacy in broiler chicks. *Poult Sci* [Internet]. 2005;84(9):1406–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ps/84.9.1406>
43. Adhikari R, White D, House JD, Kim WK. Effects of additional dosage of vitamin D₃, vitamin D₂, and 25-hydroxyvitamin D₃ on calcium and phosphorus utilization, egg quality and bone mineralization in laying hens. *Poult Sci* [Internet]. 2020;99(1):364–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez502>
44. Rao S V., Raju MVLN, Reddy MR, Pavani P. Interaction between dietary

- calcium and non-phytate phosphorus levels on growth, bone mineralization and mineral excretion in commercial broilers. *Anim Feed Sci Technol.* 2006;131(1–2):135–50.
45. Bandyopadhyay BC, Swaim WD, Liu X, Redman RS, Patterson RL, Ambudkar IS. Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca²⁺-signaling complex in polarized epithelial cells: Role in apical Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(13):12908–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M410013200>
46. Horinouchi T, Terada K, Higa T, Aoyagi H, Nishiya T, Suzuki H, et al. Function and regulation of endothelin type A receptor-operated transient receptor potential canonical channels. *J Pharmacol Sci* [Internet]. 2011;117(4):295–306. Available from: <https://doi.org/10.1254/jphs.11162FP>
47. Liu Y, Thilo F, Kreutz R, Schulz A, Wendt N, Loddenkemper C, et al. Tissue expression of TRPC3 and TRPC6 in hypertensive Munich Wistar Frömter rats showing proteinuria. *Am J Nephrol.* 2010;31(1):36–44.
48. Harks EGA, Peters PHJ, Van Dongen JLJ, Van Zoelen EJJ, Theuvenet APR. Autocrine production of prostaglandin F_{2α} enhances phenotypic transformation of normal rat kidney fibroblasts. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2005;289(1 58-1):130–7.
49. Salido GM, Sage SO, Rosado JA. TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2009;1793(2):223–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.001>
50. Dernison MM, Almirza WHMA, Kusters JMAM, van Meerwijk WPM,

- Gielen CCAM, van Zoelen EJJ, et al. Growth-dependent modulation of capacitative calcium entry in normal rat kidney fibroblasts. *Cell Signal* [Internet]. 2010;22(7):1044–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.02.007>
51. Ibeh CL, Yiu AJ, Kanaras YL, Paal E, Birnbaumer L, Jose PA, et al. Evidence for a regulated ca^{2+} entry in proximal tubular cells and its implication in calcium stone formation. *J Cell Sci*. 2019;132(9).
52. Boadi EA, Shin S, Yeroushalmi S, Choi BE, Li P, Bandyopadhyay BC. Modulation of tubular pH by acetazolamide in a ca^{2+} transport deficient mice facilitates calcium nephrolithiasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):1–21.
53. Santillán G, Baldi C, Katz S, Vazquez G, Boland R. Evidence that TRPC3 is a molecular component of the $1\alpha,25(OH)2D_3$ -activated capacitative calcium entry (CCE) in muscle and osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89–90:291–5.
54. Annalora AJ, Goodin DB, Hong WX, Zhang Q, Johnson EF, Stout CD. Crystal structure of CYP24A1, a mitochondrial cytochrome P450 involved in Vitamin D metabolism. *J Mol Biol* [Internet]. 2010;396(2):441–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.057>
55. Molin A, Lemoine S, Kaufmann M, Breton P, Nowoczyn M, Ballandonne C, et al. Overlapping Phenotypes Associated With CYP24A1, SLC34A1, and SLC34A3 Mutations: A Cohort Study of Patients With Hypersensitivity to Vitamin D. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(October).
56. De Paolis E, Scaglione GL, De Bonis M, Minucci A, Capoluongo E. CYP24A1 and SLC34A1 genetic defects associated with idiopathic infantile hypercalcemia: From genotype to phenotype. *Clin Chem Lab*

- Med. 2019;0153.
57. Chen C, White DL, Marshall B, Kim WK. Role of 25-Hydroxyvitamin D3 and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Chicken Embryo Osteogenesis, Adipogenesis, Myogenesis, and Vitamin D3 Metabolism. *Front Physiol.* 2021;12:1–10.
 58. Yan J, Pan C, Liu Y, Liao X, Chen J, Zhu Y, et al. Dietary vitamin D3 deprivation suppresses fibroblast growth factor 23 signals by reducing serum phosphorus levels in laying hens. *Anim Nutr [Internet].* 2021; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.010>
 59. Bracco OL, Kayath MJ, Vieira JGH. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2003;47(3):285–91.
 60. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene.* 2002;282(1–2):1–17.
 61. Pike JW, Zella LA, Meyer MB, Fretz JA, Kim S. Molecular actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2007;22(SUPPL. 2):16–9.
 62. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: A pleiotropic hormone. *Kidney Int [Internet].* 2010;78(2):140–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.17>
 63. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys [Internet].* 2012;523(1):9–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.003>

64. Guerreiro PM, Renfro JL, Power DM, Canario AVM. The parathyroid hormone family of peptides: Structure, tissue distribution, regulation, and potential functional roles in calcium and phosphate balance in fish. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(2).
65. Southard EB, Roff A, Fortugno T, Richie JP, Kaag M, Chinchilli VM, et al. Lead, calcium uptake, and related genetic variants in association with renal cell carcinoma risk in a cohort of male finnish smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(1):191–201.
66. Lambers TT, Mahieu F, Oancea E, Hoofd L, De Lange F, Mensenkamp AR, et al. Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport. *EMBO J*. 2006;25(13):2978–88.
67. Hemmingsen C, Staun M, Lewin E, Olgaard K. Regulation of renal calbindin-D28K: The role of calcitonin. *Calcif Tissue Int*. 1995;56(5):372–5.
68. Trautenmüller H, Abb F, Js M, Gb S, As L. Importância da vitamina D na nutrição de suínos The importance of the vitamin D in pigs nutrition
Importância da vitamina D na nutrição de suínos The importance of the vitamin D in pigs nutrition. *Rev Colomb*. 2019;11(1):1–8.
69. Li J, Yuan J, Guo Y, Sun Q, Hu X. The influence of dietary calcium and phosphorus imbalance on intestinal NaPi-IIb and calbindin mRNA expression and tibia parameters of broilers. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 2012;25(4):552–8.
70. Valable AS, Letourneau-Montminy MP, Klein S, Lardic L, Lecompte F, Metayer-Coustard S, et al. Early-life conditioning strategies to reduce dietary phosphorus in broilers: Underlying mechanisms. *J Nutr Sci*.

- 2020;9:1–9.
71. Kozak JA, Grigori R. Electrophysiological Methods for Recording CRAC and TRPV5/6 Channels. 2017. 24 p.
 72. Saotome K, Singh AK, Yelshanskaya M V., Sobolevsky AI. Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature*. 2016;534(7608):506–11.
 73. den Dekker E, Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: From identification towards regulation. *Cell Calcium*. 2003;33(5–6):497–507.
 74. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev*. 1998;78(4):1193–231.
 75. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: Bone and beyond. *Int J Exp Pathol*. 2000;81(6):405–22.
 76. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 2007;117(12):4003–8.
 77. Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev*. 2015;29(14):1463–86.
 78. Kant SG, Cervenkova I, Balek L, Trantirek L, Santen GW, De Vries MC, et al. A novel variant of FGFR3 causes proportionate short stature. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(6):763–70.
 79. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*. 2011;16(1):30–8.
 80. Wang S, Chen W, Zhang HX, Ruan D, Lin YC. Influence of particle size and calcium source on production performance, egg quality, and bone

- parameters in laying ducks. *Poult Sci* [Internet]. 2014;93(10):2560–6.
Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2014-03962>
81. Tomaszewski M, Eales J, Denniff M, Myers S, Chew GS, Nelson CP, et al. Renal mechanisms of association between fibroblast growth factor 1 and blood pressure. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(12):3151–60.
 82. Mishra B, Jha R. Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. *Front Vet Sci*. 2019;6(MAR):1–5.
 83. Svihus B. Function of the digestive system. *J Appl Poult Res* [Internet]. 2014;23(2):306–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2014-00937>
 84. Amerah AM, Ravindran V, Lentle RG, Thomas DG. Feed particle size: Implications on the digestion and performance of poultry. *Worlds Poult Sci J*. 2007;63(3):439–55.
 85. Cufadar Dr. Y, Olgun O, Yildiz AÖ. The effect of dietary calcium concentration and particle size on performance, eggshell quality, bone mechanical properties and tibia mineral contents in moulted laying hens. *Br Poult Sci*. 2011;52(6):761–8.
 86. Zaefarian F, Abdollahi MR, Ravindran V. Particle size and feed form in broiler diets: Impact on gastrointestinal tract development and gut health. *Worlds Poult Sci J*. 2016;72(2):277–90.
 87. Englmaierová M, Skřivan M, Skřivanová E, Čermák L. Limestone particle size and *Aspergillus niger* phytase in the diet of older hens. *Ital J Anim Sci* [Internet]. 2017;16(4):608–15. Available from: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1309258>
 88. Bar A, Razaphkovsky V, Vax E. Re-evaluation of calcium and phosphorus

- requirements in aged laying hens. *Br Poult Sci.* 2002;43(2):261–9.
89. Park SY, Birkhold SG, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction. *Biol Trace Elem Res.* 2004;101(2):147–63.
90. San J, Zhang Z, Bu S, Zhang M, Hu J, Yang J, et al. Changes in duodenal and nephritic Ca and P absorption in hens during different egg-laying periods. *Heliyon* [Internet]. 2021;7(06081):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06081>
91. Vargas JG, Albino LFT, Rostagno HS, Gomes PC, Cupertino ES, De Oliveira Carvalho DC, et al. Nutritional levels of calcium and available phosphorus for white-egg pullets and brown-egg pullets from 7 to 12 weeks of age. *Rev Bras Zootec.* 2004;33(4):936–46.

Supporting information

Supplementary file 1. Table S1. Means and standard error of the variables evaluated according to the treatments. Table S2. Gene ranking showing the most stable genes among different tools evaluated. Table S3. Kruskal-wallis results according to each comparison of the studied groups.

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido a Revista PlosOne

Análise do perfil do transcriptoma do duodeno de galinhas poedeiras submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio de fósforo

Letícia Alves Salmória¹, Adriana Mércia Guaratini Ibelli^{1,2}, Fernando de Castro Tavernari^{2,3}, Jane de Oliveira Peixoto^{1,2}, Marcos Antônio Zanella Morés², Débora Ester Petry Marcelino⁴, Mônica Corrêa Ledur^{2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brasil.

² Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Centro de Educação Superior do Oeste (CEO). Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Chapecó, Santa Catarina, Brazil.

⁴ Faculdade de Concórdia, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

*Corresponding author

e-mail: monica.ledur@embrapa.br

Resumo

O cálcio e o fósforo são essenciais na nutrição das poedeiras, atuam na composição óssea e na formação da casca do ovo. Porém, níveis inadequados tendem a resultar na baixa produtividade e interferir no bem - estar animal, principalmente após o pico de postura, onde ocorre a redução metabólica da absorção mineral pelas poedeiras. Neste estudo buscamos compreender os

mecanismos de regulação de cálcio e fósforo em poedeiras com idade avançada, por meio da análise de expressão gênica com a metodologia RNA-Seq, utilizando amostras de duodeno. No total foram 27 amostras, coletadas de poedeiras Bovans White, com 73 semanas de idade. As amostras foram provenientes de três grupos de poedeiras, que apresentaram diferentes parâmetros de produção (ovos bons, peso dos ovos, resistência da casca, entre outros), sendo eles: Alto desempenho (HP), (22,43% Ca/P), baixo desempenho (HL) (6,71% Ca/P) e um grupo com dieta padrão, (STD) (11,43% Ca/P). O RNA total foi extraído, as bibliotecas foram preparadas, utilizando o kit Illumina Stranded mRNA Prep com sequência de pares de bases.

Posteriormente, as leituras foram submetidas ao controle de qualidade usando o Trimomatic e foram mapeadas contra o genoma de referência (GRCg6a) utilizando o STAR. Para anotação funcional foram utilizadas as bases de dados PHANTER e MsigDB, para a análise estatística, através do programa R foi utilizado o pacote limma com o método *voom*. Como resultado, 105 genes foram diferencialmente expressos (DE, FDR < 0.05), na comparação entre os grupos. Destes destacam-se: *CAV1*, *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI*, *TNIP3*, *COL3A1*, *PKIA*, *FGF7*, *PTHLH*, *ADIPOQ*, *COLEC11* e *HAND2*. Através do estudo identificamos novos genes candidatos a regulação de Cálcio e Fósforo em poedeiras com idade avançada. Os processos quais os genes diferencialmente expressos foram enriquecidos podem ter contribuído nos diferentes níveis de desempenho apresentados pelas poedeiras.

Keywords: transcriptoma, poedeiras, nutrigenômica minerais.

Introdução

Os minerais são fundamentais para a realização de processos biológicos importantes no organismo animal (1). Em poedeiras, os principais constituintes da dieta são o Cálcio (Ca) e o Fósforo (P), que atuam na composição óssea e formação da casca do ovo (2). Por este motivo, estão presentes em maior abundância no organismo (3). Cerca de 99% do total de Ca e 85% do total de (P) estão presente nos ossos (4).

A metabolização dos minerais no organismo é mediada pela ação de diferentes hormônios, sendo eles: estrogênio (E2), paratormônio (PTH), calcitonina e vitamina D (1,25(OH)₂D₃1,25) (5). Os hormônios são controlados por diferentes órgãos, que são responsáveis pelos mecanismos de controle e homeostasia (6). O intestino é o principal órgão de absorção, possuindo uma via transcelular considerada a mais importante para o aproveitamento dos minerais pelas aves (7,8). Além disso, o osso, por ser o principal reservatório de minerais, por meio dele ocorre a reabsorção mineral e o rim realiza o processo de filtração glomerular, reabsorção tubular e excreção mineral (9).

Mesmo com o elaborado sistema de regulação mineral, existem muitos fatores que podem prejudicar o aproveitamento dos minerais no organismo (10). A existência do antagonismo entre Ca e P e a baixa capacidade de absorção tornaram-se um desafio na nutrição, pois geralmente a diminuição da capacidade de absorção mineral pelas poedeiras ocorre após o pico de postura, e à medida que as aves envelhecem (11,12). Estima-se que 15% das perdas na produção estejam relacionadas com a má qualidade da casca dos ovos (13). Portanto, muitas estratégias de suplementação mineral são

realizadas para que as poedeiras alcancem o máximo potencial produtivo (14).

Alguns trabalhos já demonstraram a relação entre a ação de transportadores de íons minerais e a sua influência na produção, diante de diferentes relações de Ca/P em distintas fases de postura (15–17). Porém, em poedeiras em idade avançada existem poucos trabalhos que elucidam os mecanismos de regulação mineral, baseados na análise de expressão gênica (12,16,18,19).

Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados aos mecanismos homeostáticos de absorção de Ca e P, utilizando amostras do duodeno, por ser considerado importante órgão de absorção. As poedeiras utilizadas, da linhagem Bovans White, possuíam 73 semanas de idade, e receberam diferentes relações de Ca/P na dieta. Sendo assim, foi analisado o perfil de expressão do duodeno, utilizando a técnica de RNA-Seq, a fim de compreender o perfil de expressão gênica e os processos biológicos envolvidos na resposta das diferentes relações de Ca/P fornecidos na dieta e sua influência no desempenho dos animais.

Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética seguindo as normas editadas pelo conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e aprovada pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Embrapa Suínos e Aves (017/2016). O estudo foi realizado com poedeiras leves da linhagem Bovans White, com 73 semanas de idade. No total nove grupos foram estudados, esses grupos receberam diferentes relações de Ca e P na dieta, no

total 630 aves, em esquema fatorial com 1 repetições de 7 aves por gaiola (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes relações de Cálcio e Fósforo fornecidas na dieta de poedeiras Bovans White.

Tratamento	Ca, %	P disp, %	Relação Ca/P disp, %
1	4,71	0,49	9,61
2	4,71	0,21	22,43
3	3,29	0,49	6,71
4	3,29	0,21	15,67
5	4,00	0,35	11,43
6	5,00	0,35	14,29
7	3,00	0,35	8,57
8	4,00	0,55	7,27
9	4,00	0,15	26,67

As rações fornecidas foram formuladas de acordo com Rostagno et al. 2017 (20). A granulometria utilizada de calcário, para composição das rações, foi de 50% fino e 50% grosso utilizado na indústria. Os grupos receberam as diferentes relações de Ca/P a partir das 20 semanas de idade, com término nas 73 semanas, totalizando 53 semanas de experimento. De nove tratamentos do experimento (Tabela suplementar 1), três foram escolhidos de acordo com os níveis fornecidos e os respectivos níveis de desempenho, sendo eles: (HP) alto desempenho (Ca 4,71% e 0,21% P) com relação 22,43 Ca/P, (LP) baixo desempenho (Ca 3,29% e 0,49% P) com relação 6,71% Ca/P e (STD) dieta padrão (4% de Ca e 0,35% de P) com relação 11,43 Ca/P, comumente fornecida na dieta de aves de postura. Posteriormente as aves foram sacrificadas por luxação cervical, e em seguida foi realizada a coleta de amostras do duodeno. Foram utilizadas 27 amostras do duodeno, sendo 9 amostras por grupo escolhido. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente foram mantidas a menos 70°C até o momento da

extração do RNA total. Além da extração, também foram coletadas para análise histopatológica.

Análise histológica do duodeno

As amostras foram coletadas e lavadas com solução salina tamponada (PBS), em seguida foram armazenadas em paraformaldeído 4% e desidratadas em diferentes concentrações de etanol. Posteriormente passaram pelo processo de diafanização com o uso de xilol, em seguida foram embebidas em parafina. Os cortes foram realizados no micrótomo automático, resultando em 2 a 5 μm de espessura, em seguida foram coradas com hematoxilina e eosina. Utilizando o aparelho microscópio (Olympus BX53), foi possível realizar a avaliação dos tecidos. As imagens correspondentes as amostras dos três grupos estudados foram capturadas por foto no aparelho microscópio (AXIO Scope AI), na objetiva 20x e 50x.

Extração e quantificação de RNA

As 27 amostras coletadas foram utilizadas para a extração de RNA total, a partir de 100 mg com o uso do reagente de Trizol (Life Technologies, USA), conforme instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de RNA passaram pelo protocolo de purificação clean-up utilizando colunas de sílica e protocolo recomendado pelo kit Qiagen RNeasy (Qiagen, Germany). A concentração do RNA foi mensurada por meio do aparelho Biodrop (Biodrop, UK) utilizando 1 μL de cada amostra. A concentração do RNA total foi estimada pela densidade óptica (DO) da solução, através de espectrofotometria, mensurando-se a absorbância a 260 nm e 280 nm. A relação A260/A280 foi utilizada para a

avaliação da pureza do RNA, a qual foi considerada adequada no intervalo de 1,9 a 2,1. Para análise da integridade do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X. As amostras também tiveram a avaliação da integridade no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA), considerando apenas valores de RIN (Número da integridade do RNA) maiores que 8 para a construção das bibliotecas.

Preparo de bibliotecas

Para preparo de bibliotecas foi utilizado 1 µg de RNA total de cada amostra, realizada com o kit Illumina Stranded mRNA (Illumina), seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas passaram pela avaliação no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) obtendo uma média de tamanho de 300bp para cada amostra. Após verificação da concentração e tamanho das bibliotecas, as amostras foram enviadas para sequenciamento paired-end (2x100 bp) na empresa NGS soluções genômicas (Piracicaba, Brasil) em equipamento Illumina HiSeq2500 (Illumina, EUA).

Controle de qualidade e mapeamento

As sequências obtidas após o sequenciamento passaram pelo controle de qualidade (QC) e o relatório de qualidade foi gerado na versão 1.7 em arquivo no formato FASTQ. Para controle de qualidade, a ferramenta Trimmomatic, foi aplicada para a remoção das leituras curtas (<55 bp), leituras de baixa qualidade (QPhred <24), sequências adaptadoras e contaminantes (21). Posteriormente, para alinhamento e mapeamento das sequências, foi

utilizado o alinhador STAR 2.7 (22), contra o genoma de referência da galinha (*Gallus gallus*) (GRCg6a), disponível no banco de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), versão 104.

Análise de expressão diferencial

A análise de expressão diferencial dos genes foi realizada utilizando o pacote *limma* do Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) através do programa R (23). O pacote *limma* utiliza o método *voom*, modelagem linear e análise Bayes empírica, para analisar e avaliar a expressão diferencial. O método *voom* permite diminuir a heterocidasticidade, observando a variância das contagens não dependentes da média, convertendo as contagens brutas em log de cópia por milhão (CPM) (24). A significância de genes DE foi estimada considerando o nível de *false Discovery rate* (FDR) $\leq 0,05$ como significativo. Um gráfico de escala multidimensional (MDS) foi criado com R, usando os valores de *Log2 Fold Change* (LogFC) de cada gene expresso no duodeno.

Anotação funcional de genes diferencialmente expressos

Para a descoberta dos processos biológicos, foi utilizado o banco de dados PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). Também foi utilizado o Molecular Signatures Database (MSigDB) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>) para anotação funcional, e descoberta de genes enriquecidos.

Resultados

Histologia do duodeno

Na avaliação microscopia das amostras do duodeno os três grupos estudados apresentaram pequenas alterações nas análises de histologia. A seguir são apresentadas imagens com duas amostras de cada grupo, amostra sem alteração e amostras com achados histopatológicos. Grupo HP relação 22,43 Ca/P (Fig 1. A e B), grupo STD relação 11,43 Ca/P (Fig 1. C e D), e grupo LP relação 6,71 Ca/P (Fig 1. E e F), respectivamente.

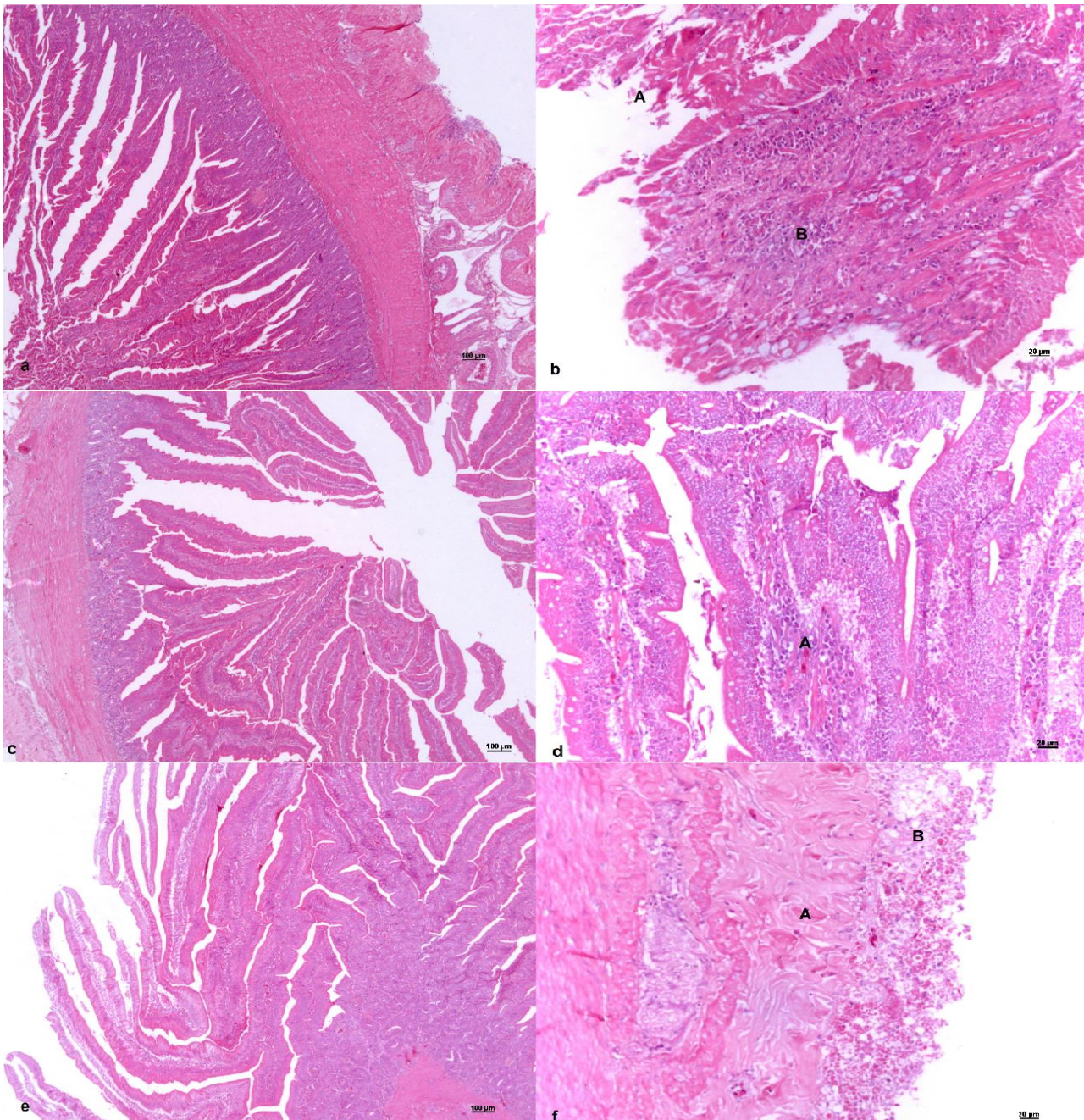


Figura 1. Amostras do duodeno coradas com eosina e hematoxilina.

Grupo LP. a) Serosa do duodeno sem alteração histopatológica. b) A. Tecido descamado B. presença de células linfocitárias. **Grupo HP.** c) Musculatura serosa sem alteração. d) A Presença de infiltrado inflamatório. **Grupo STD** e) Serosa do duodeno sem alteração histopatológica. f) A. Serosa com presença de material proteico. B. Descamação tecidual em decorrência do tempo de coleta.

Sequenciamento e mapeamento de *reads*

O sequenciamento das amostras de duodeno produziu aproximadamente 332 milhões de *reads* (2x100 pb), com média de 12 milhões de *reads* por amostra. Após o controle de qualidade, permaneceram cerca de 11 milhões de *reads* por amostra (Tabela 2). Destas, aproximadamente 80,09% das *reads* foram mapeadas contra o genoma de referência *Gallus gallus* (GRCg6a) Ensembl versão 104, utilizando o *software* STAR.

Tabela 2. Número de leituras por amostra antes e após a análise de controle de qualidade.

Amostras	Pares de leituras antes QC	Pares de leituras após QC	% após QC
102	12811193	12301280	96,02
105	14468424	13757336	95,09
106	10289696	9838205	95,61
115	10249469	9812329	95,73
127	13245607	12588014	95,04
132	11230444	10792229	96,1
137	12916379	12398031	95,99
140	10819094	10387132	96,01
155	14639904	13940789	95,22
158	11998397	11507558	95,91
165	12604306	12162895	96,5
22	13625620	13092883	96,09
26	14121964	13446277	95,22
29	14053953	13322872	94,8
32	12539670	11927499	95,12
35	13743210	13076289	95,15
50	12483645	11889006	95,24
57	12558443	12067928	96,09
59	10628071	10263249	96,57
61	13584797	12999296	95,69
75	11437603	10915755	95,44
78	11097428	10612785	95,63
80	9756925	9273026	95,04
81	12162513	11698456	96,18
82	13514486	12948051	95,81
8	10532469	10101366	95,91
96	11869580	11443322	96,41

O gráfico de escala multidimensional (MDS) foi gerado utilizando os resultados de LogFC, para os grupos de amostras (figura 2). Contudo, não foi observada a separação clara dos 3 grupos neste conjunto de dados, o que indica que os efeitos dos tratamentos são influenciados por um pequeno número de genes.

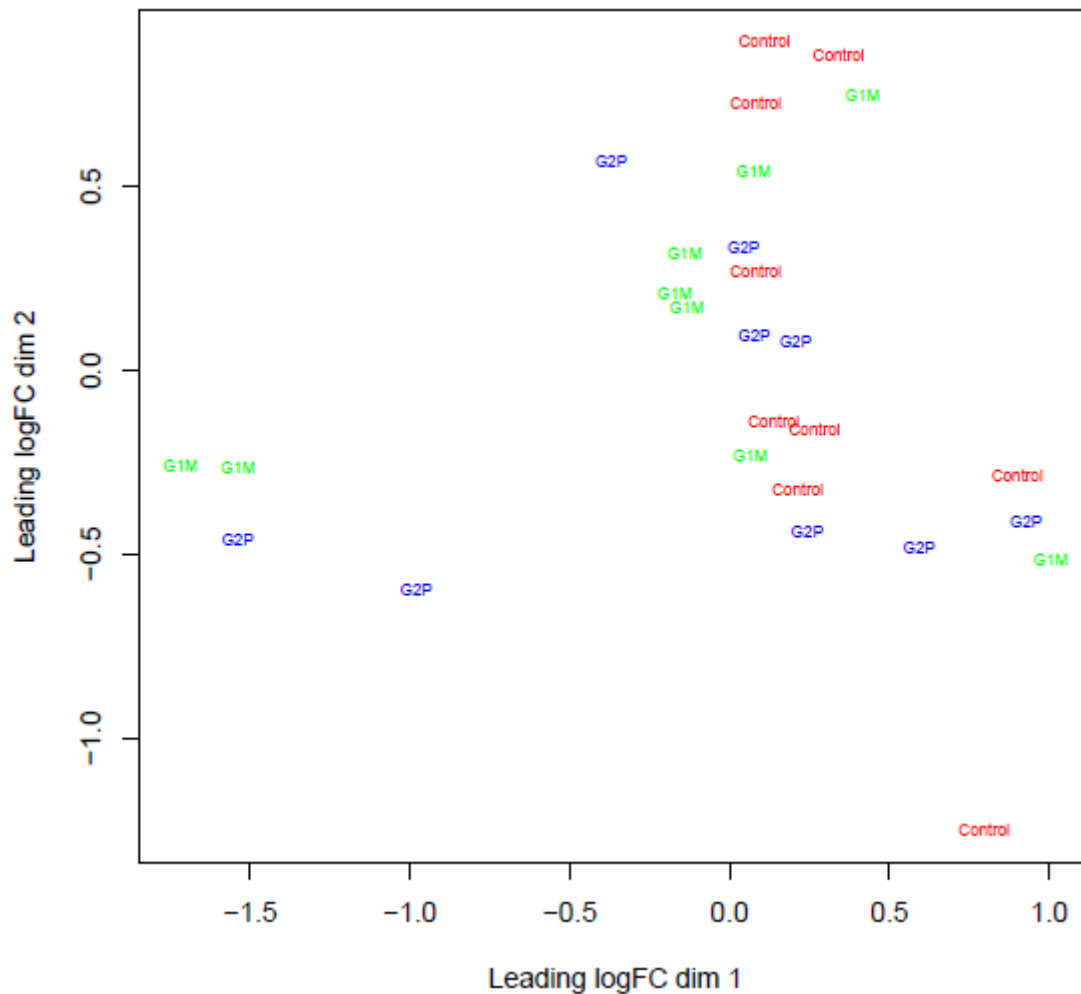


Figura 2. Gráfico de Escala multidimensional (MDS) com as amostras do grupo com a dieta padrão (STD) em vermelho, grupo de alto desempenho (HP) em verde e grupo de baixo desempenho (LP) em azul.

Genes diferencialmente expressos

No total, 12711 genes foram expressos no tecido do duodeno (Tabela suplementar 2). Na comparação entre os três grupos, foram encontrados 107 genes DE (FDR \leq 0,05) (Tabela suplementar 3). Dois genes foram DE (FDR \leq 0,05) na comparação entre HP (22,43 Ca/P), comparado com STD (11,43 Ca/P) (figura 3). O gene *TNIP3* (*TNFAIP3 interacting protein 3*) foi DE duas vezes mais no grupo HP (p adj. $<$ 0.05), e *ENSGALG00000051077* foi DE expresso quatro vezes mais no grupo STD (p adj. $<$ 0.05) (Tabela suplementar 5). Na comparação entre o grupo LP (6,71 Ca/P) e o STD (11,43 Ca/P), não houve genes DE (Tabela suplementar 6).

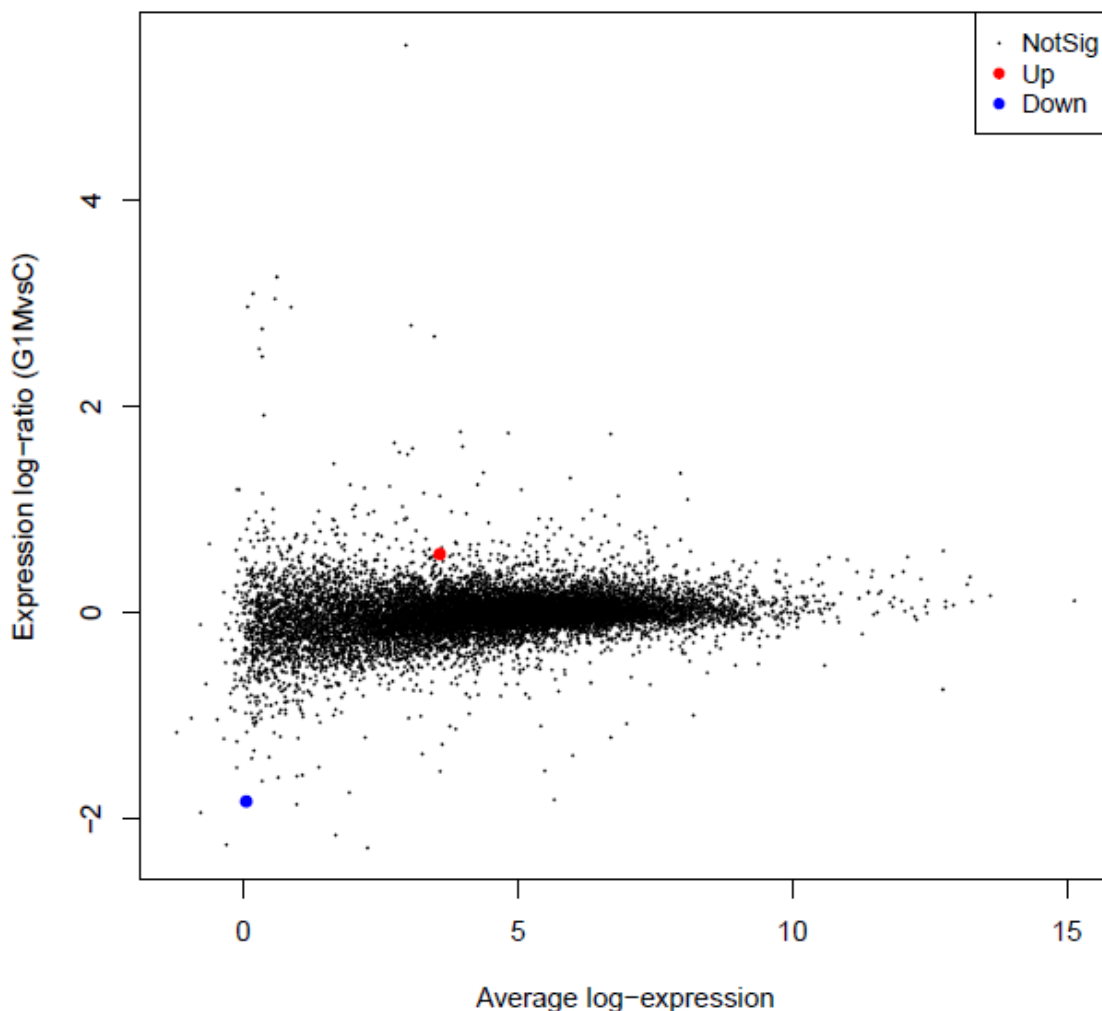


Figura 3. Representação dos grupos de melhor desempenho e dieta padrão, com dois genes DE, (FDR $<$ 0,05) com regulação negativa e positiva.

Em comparação entre HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P) 105 genes foram DE (Tabela suplementar 2), quais 85 foram DE no grupo HP, e 20 genes foram DE no grupo LP (6,71 Ca/P) (Figura 4).

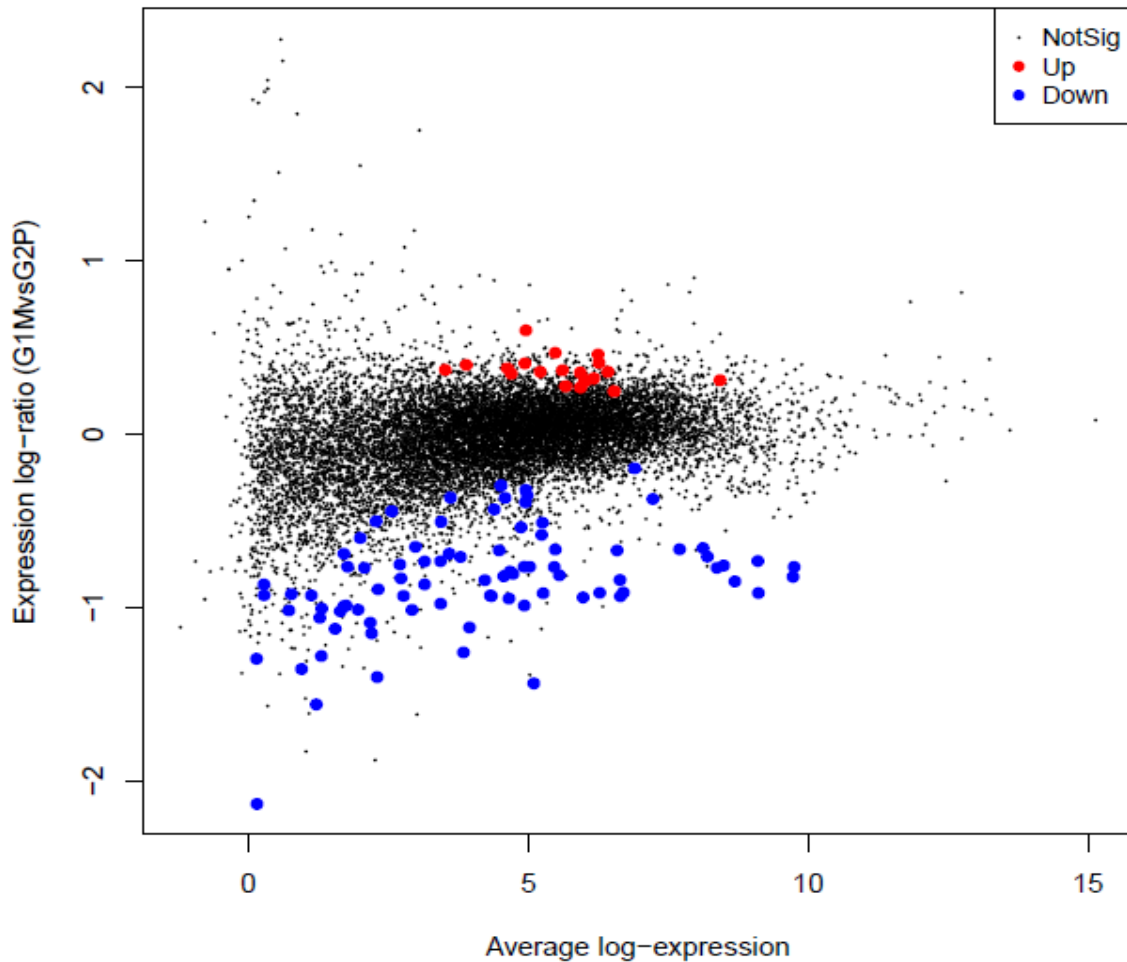


Figura 4. Representação dos grupos de HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P). Genes diferencialmente expressos (FDR < 0,05). Eixo x representa a média dos valores de expressão, e o eixo y são os valores de Log2FC.

Anotação funcional

Utilizando a base de dados PANTHER, foram encontrados diferentes

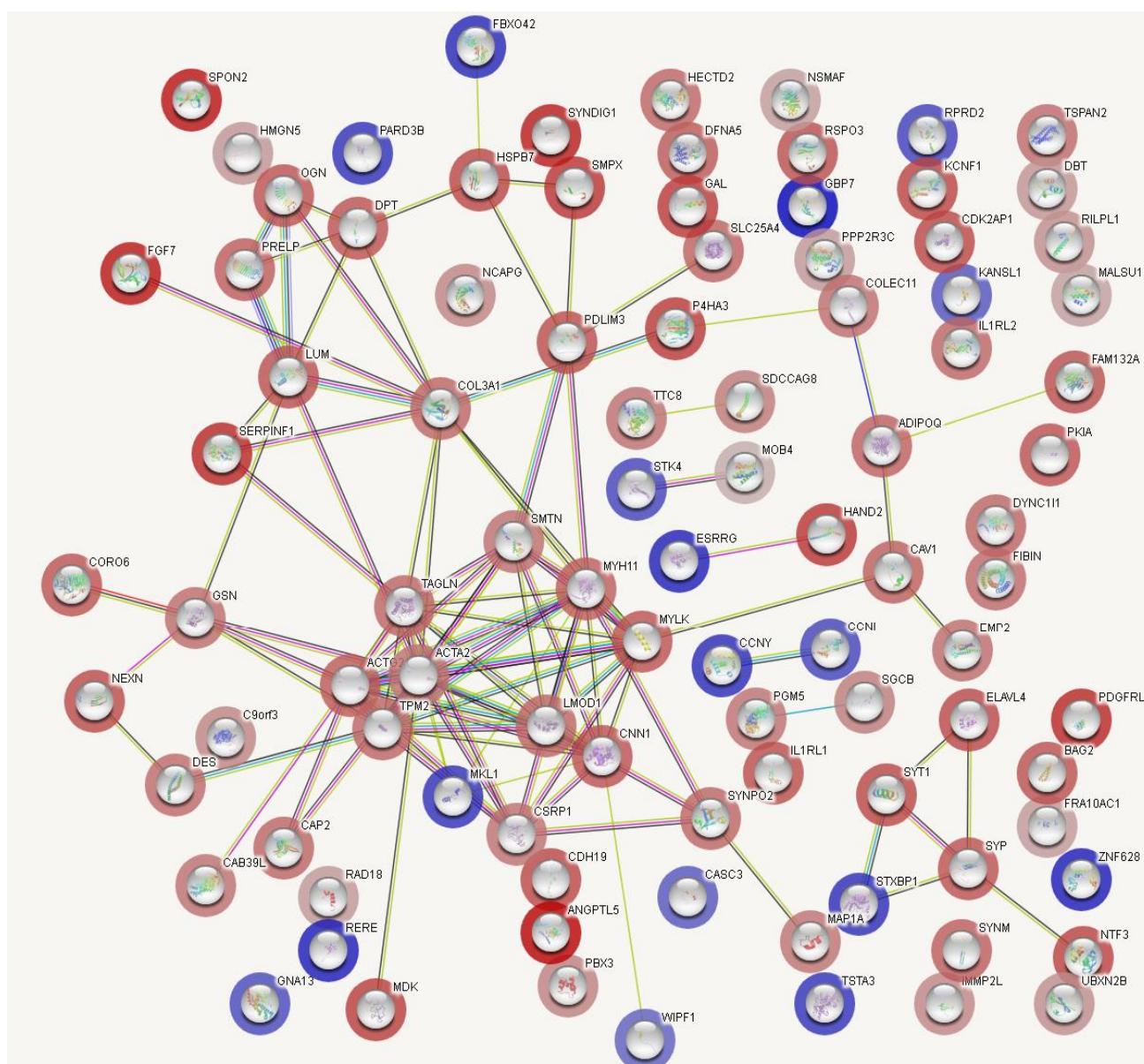
processos biológicos envolvidos (Tabela suplementar 6), destacando-se principalmente: homeostase mineral, resposta hormonal e resposta imune. Entre o grupo HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P), dos 105 genes DE encontrados, destacam-se os listados na tabela (Tabela 3).

Tabela 3. Processos biológicos encontrados no PANTHER database, referentes aos genes DE nas amostras de duodeno, entre o grupo de melhor desempenho (HP) e o grupo que recebeu a dieta padrão (STD).

Termo ID	Processos biológicos	Genes enriquecidos	FDR
GO: 1903235	Regulação da excitose dependente de íons de cálcio	<i>SYT1</i>	1,20E-02
GO: 0003012	Processo do sistema muscular	<i>MYLK, TPM2, SYNM, ACTA2, GSN, MYH11, LMOD1</i>	5,11E-07
GO: 0032570	Resposta à progesterona	<i>CAV1</i>	1,13E-01
GO: 1900046	Regulação da homeostasia	<i>CAV1</i>	2,19E-01
GO: 0010522	Regulação do transporte de íons de cálcio para o citosol	<i>CAV1</i>	2,78E-01
GO: 0071774	Resposta ao fator de crescimento de fibroblastos	<i>FGF7</i>	2,87E-01
GO: 0010562	Regulação positiva do processo metabólico do fósforo	<i>CCNY, STK4, EMP2, CABL39, CAV1, PPP2R3C, ADIPOQ, NTF3, FGF7,</i>	4,25E-03
GO: 0048771	Remodelação de tecidos	<i>RSPO3</i>	3,20E-01
GO: 0009653	Morfogênese da estrutura anatômica	<i>MYLK, RERE, STAK4, CAV1, RSPO3, GNA13, CDH19, HAND2, NEXN, CAP2, TTC8, RILPL1, PGM5, SDCCAG8, MAPIA, ACTA2, MYH11, NTF3, CSRP1, FGF7</i>	1,22E-05
GO: 0050727	Regulação da resposta inflamatória	<i>IL1RL1, IL1RL2</i>	2,56E-01
GO: 0031325	Regulação do processo metabólico celular	<i>HAND2, CCNY, STAK4, ESRRG, EMP2, CAB39L, CAV1, RERE, PPP2R3C, ADIPOQ, GNS, NTF3, GAL, LUM,</i>	1,46E-01

FGF7,STAK4, DBT, SLC25A4

GO: 0009725	Resposta ao hormônio	<i>ESRRG, CAV1, FIBIN</i>	5,06E-01
GO: 0006874	Homeostase celular de íons de cálcio	<i>CAV1</i>	6,81E-01
GO: 0080134	Regulação da resposta ao estresse	<i>HAND2, IL1RL2, MYLK, CAV1, IL1RL2</i>	6,30E-01
GO: 0050778	Regulação da resposta imune	<i>COLEC11</i>	7,21E-01
GO: 0006816	Transporte de íons de cálcio	<i>CAV1</i>	6,81E-01
GO: 0051464	Regulação da secreção de cortisol	<i>GAL</i>	3,55E-02

Através do banco de dados STRING: *functional protein association*

networks, foi gerado uma rede de interação gênica, de interação proteína – proteína, com os 105 genes DE nas comparações entre o grupo HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P) (Tabela suplementar 3) (Figura 5).

Figura 5. Rede de interação gênica realizado através da base de dados STRING, com os 105 genes DE no duodeno, na comparação entre HP (22,43 Ca/P) e LP (6,71 Ca/P).

Utilizando o MSigDB com o genoma humano, 25 genes DE encontrados foram enriquecidos em três diferentes processos: Transição do epitélio mesenquimal, miogênese e resposta tardia ao estrógeno (Tabela 4).

Tabela 4. Processos e seus respectivos genes enriquecidos, encontrados através do MSigDB.

Processos biológicos	Gene ID	p.adjust
Transição mesenquimal do epitélio	<i>WIPF1,SGCB,ACTA2,TAGLN,CAP2,COL3A1,TPM2,PTHLH,MYLK,LUM</i>	4,96E-06
Miogênese	<i>GSN,SMTN,DES,TAGLN,COL3A1,TPM2,MYH11,MYLK,PKIA</i>	3,13E-04
Resposta tardia ao estrógeno	<i>TSTA3,EMP2,CAV1,PDLIM3,MDK,GAL</i>	3,69E-02

Discussão

No presente estudo, foram identificados no total 12.711 genes expressos no duodeno de poedeiras Bovans White, com 73 semanas de idade. Destes 107 foram DE entre os três grupos estudados, sendo eles HP (22,43 Ca/P), LP (6,71 Ca/P) e STD (11,43 Ca/P) (Tabela suplementar 2). Nas comparações realizadas entre o HP (22,43 Ca/P) e o LP (6,71 Ca/P), 105 genes foram DE.

Destes, 85 genes estavam sendo menos expressos, e 20 superexpressos no HP (22,43 Ca/P), comparado com o LP (6,71 Ca/P) (Tabela suplementar 3). As análises de anotação funcional revelaram processos fisiológicos importantes (Tabela 5). Entre o HP (22,43 Ca/P) e o STD (11,43 Ca/P), dois genes foram DE, sendo um regulado positivamente e outro negativamente no HP, sendo eles: *TNIP3* superexpresso e o *ENSGALG00000051077* menos expresso (Tabela suplementar 5).

Dos genes DE encontrados destacam-se principalmente *CAV1* (*Caveolin*), *MYLK* (*Myosin Light Chain Kinase*), *CAB39L* (*Calcium Binding Protein 39 Like*), *ILIRLI* (*Interleukin 1 receptor like*), *TNIP3* (*Interacting Protein 3*), *COL3A1* (*Collagen Type III Alpha 1 Chain*), *PKIA* (*CAMP Dependent Protein Kinase Inhibitor Alpha*), *FGF7* (*Fibroblast Growth Factor 7*), *ESRRG* (*Estrogen Related Receptor Gamma*) *PTH1LH* (*Parathyroid Hormone Like Hormone*), *ADIPOQ* (*Adiponectin, C1Q and Collagen Domain*), *COLEC11* (*Collectin Subfamily Member 11*) e *HAND2* (*Heart and Neural Crest Derivates Expressed 2*) (Tabela 5). Os genes DE apresentaram funções em processos biológicos relacionados ao Ca e P. A seguir são apresentados os principais processos:

Homeostasia de cálcio

A ação da vitamina D é mediada pelo seu receptor *VDR* (*Vitamin D Receptor*), que possibilita uma rápida absorção de Ca no intestino. Diante disso, o gene *CAV1* codifica a proteína estrutural da caveolina, a qual possui estreita associação com o *VDR*, que se liga a vitamina D ativa (1,25 (OH)₂D₃) permitindo o aumento da absorção de Ca na mucosa intestinal (25). Nas análises realizadas, o gene *CAV1* foi três vezes mais DE (p adj. < 0.05) no

grupo HP, grupo que recebeu maiores níveis de Ca/P (22,43 Ca/P), e apresentou maiores índices produtivos como ovos bons, peso da casca, resistência a quebra e porcentagem da casca (Tabela suplementar 1). Aproximadamente 75% da composição mineral da casca do ovo é proveniente da dieta fornecida (26). A expressão diferencial do gene *CAV1* no grupo HP, possui estreita relação com o melhor aproveitamento de cálcio, pois, a sua via de sinalização é completamente mediada por cálcio, de modo que a maior concentração de Ca^{+2} disponível na dieta facilitou a absorção de íons na forma passiva, possibilitando melhor captação e aproveitamento pelo duodeno. Este mesmo mecanismo mediado por *CAV1*, também já foi descrito por Conway et al. (27).

Além disso, *CAV1* também é responsável pela modulação de respostas inflamatórias, através da síntese de mediadores inflamatórios (28). Participa de processos de angiogênese, remodelação de células endoteliais (29). *CAV1* foi enriquecido em diferentes processos biológicos relacionados com homeostasia de íons Cálcio, regulação da homeostasia, bem como também resposta a progesterona. No grupo LP (6,71 Ca/P), o mesmo não foi DE, este grupo recebeu níveis inferiores de Ca/P na dieta, os animais desse grupo foram os que apresentaram menores índices nas características de resistência da casca e produção de ovos (Tabela suplementar 1).

O gene *CAB39L* é codificador de uma proteína de ligação ao cálcio, possui relação com a sinalização de proteína quinase por AMP (AMPK) (30). *CAB39L* já foi associado a atividade osteoclástica em aves, elevando a absorção mineral no intestino, por estimular a degradação da matrix óssea (3,31–33). O mesmo foi quatro vezes mais DE (p adj. < 0.05) no grupo LP (6,71

Ca/P). Como atua na estimulação e elevação da absorção mineral, pode ter contribuído na compensação mineral, pelos níveis menores de Ca e P que foram fornecidos no LP (6,71 Ca/P).

Resposta imune

O gene *FGF7* da família de fator de crescimento de fibroblastos, participa de processos que estimulam a proliferação celular, produção de colágeno e produção de outros elementos da matriz celular (34,35). Em humanos, já foi associado com a regulação da invasão e migração de câncer gástrico (36). Em camundongos, pesquisadores compararam a resposta entre a ausência e presença do gene *FGF7*, em camundongos diabéticos. Os resultados indicaram que houve um aumento significativo no atraso da cicatrização de feridas em camundongos com ausência do gene *FGF7* (37). Genes da família de fator de crescimento fibroblastos (FGF), estão envolvidos em muitos mecanismos, os mecanismos de transporte de íons e da vitamina D (25,38). *FGF7*, foi quatro vezes mais (p adj. < 0.05) DE no grupo LP (6,71 Ca/P), em comparação com o grupo HP (22,34 Ca/P).

O receptor de interleucina *IL1RL1* foi associado a distúrbios imunológicos e inflamatórios (39). Em animais, o gene *IL1RL1* desempenha papel importante na ativação de células do processo imune, nas etapas iniciais da inflamação (39). O receptor de interleucina também é conhecido por realizar a supressão de tumorigênese (40). Assim como *FGF7*, o gene *IL1LR1* foi quatro vezes mais DE (p adj. < 0.05) no grupo LP (6,71 Ca/P).

O gene *MYLK* é participante vital na regulação de respostas da barreira vascular, estímulos mecânicos e inflamatórios (41). Estudos demonstraram que

em respostas ao estresse, a geração de variantes do gene *MYKL* contribuíram para a gravidade de lesões inflamatórias (41). O gene *COL3A1* é considerado um dos principais colágenos constituintes na integridade do intestino, atuando junto com outros colágenos na cicatrização tecidual (42). *TNIP3* também já foi associado a funções de resposta imune e resposta ao estresse (43,44). Assim como, *COLEC11* e *HAND2* que foram enriquecidos em processos de resposta imune, resposta ao estresse e remodelação de tecidos (Tabela 5). Todos estes genes foram DE (p adj. < 0.05) no grupo LP (6,71 Ca/P), em comparação com o grupo HP (22,34 Ca/P).

O grupo LP (6,71 Ca/P), foi o que apresentou parâmetros produtivos inferiores quando comparado com os outros grupos estudados, HP (22,34 Ca/P) e STD (11,43 Ca/P). Portanto, comparando os resultados de desempenho (Tabela suplementar 1), achados histológicos com a presença de infiltrado inflamatório (Figura 1), e as funções desempenhadas por *FGF7*, *IL1LR1*, *MYLK*, *TNIP3*, *COL3A1*, *COLEC11* e *HAND2*, como, processos de cicatrização tecidual, resposta ao estresse, ativação de células do sistema imune, esses fatores podem ter contribuído com o menor desempenho do grupo. Corroborando com Mishra & Jha (2019); Xiang et al. (2019) (45,46), as respostas inflamatórias podem resultar em dificuldade de absorção pelas vilosidades intestinais, desencadeando estresse oxidativo, podendo ser derivado de fatores nutricionais, que levam a alteração de desempenho. Sendo assim, os menores níveis de desempenho grupo LP (6,71 Ca/P), podem ser provenientes destas respostas.

Resposta hormonal

O gene *PTH LH* possui atividade hormonal e ligação ao receptor de hormônio. Suas funções já foram relacionadas a mecanismos de seleção de folículos ovarianos em poedeiras, sofrendo regulação transcricional aos efeitos genéticos associados a características de postura em poedeiras, porém esses mecanismos ainda são desconhecidos (32). Na fisiologia de proliferação de células da granulosa folicular, o *PTH LH* opera no estímulo da produção de progesterona (P4) em folículos pré-hierárquicos (47). Um estudo conduzido por Guo et al. (2019) (32), indicou que o *PTH LH* tem efeito sobre o desempenho de postura. *PTH LH* é regulado positivamente na musculatura lisa, além de atuar na proliferação do músculo liso (48,49).

Além disso, o *PTH LH* possui ampla associação com o hormônio da paratireoide (*PTH*), mediador importante na regulação dos níveis séricos de Ca e P, os dois podem se ligar ao mesmo receptor do hormônio da paratireoide (50–52). *PTH LH* também é considerado essencial por desempenhar papéis na regulação e transporte de íons de cálcio, e na atuação da reabsorção mineral (53,54). O mesmo foi DE três vezes mais (p adj. < 0.05) no grupo LP (6,71 Ca/P) em relação ao HP (22,34 Ca/P). LP (6,71 Ca/P) apresentou índices de desempenho menores em relação aos outros dois grupos, em relação a produção de ovos bons e resistência da casca (Tabela suplementar 1), este gene de alguma forma pode ter sido mais expresso, como forma compensatória de absorção mineral, principalmente por ser amplamente associado ao mesmo receptor de *PTH*.

Outro hormônio atuante em características da produção do ovo, é o estrogênio, produzido pelos folículos pequenos e pré-ovulatórios. O gene codificador da proteína de estrogênio *ESRRG* foi quatro vezes mais DE (p adj.

< 0.05) no HP (22,43 Ca/P) em relação ao LP (6,71 Ca/P), já tendo sido observado que sua expressão foi aumentada em estágios de pico de produção, pois através dele ocorre a alta mobilização de Ca proveniente dos ossos, para a formação da casca do ovo (55,56). Desta forma, é possível dizer que seu perfil de expressão pode estar relacionado com maiores índices de produção, em características de qualidade dos ovos (resistência, % da casca, produção de ovos bons e espessura da casca), proporcionando melhor deposição mineral devido aos níveis de Ca/P na dieta no grupo HP (22,43 Ca/P) (Tabela suplementar 1). Os níveis de estrogênio se elevam a medida que ocorre o início da postura, seu aumento ocorre devido nível sérico de Ca presente, para atuar na deposição de carbonato de cálcio (CaCO_3) na casca do ovo (57).

Ainda sobre a expressão diferencial de genes com respostas hormonais, o gene *EMP* foi três vezes mais DE (p adj. < 0.05) no HP (22,43 Ca/P), quando comparado com o LP (6,71 Ca/P), o mesmo atua em processos de homeostase de colesterol, sendo este, composto vital para a produção de hormônios (58). O gene da adiponectina (*ADIPOQ*) possui função na regulação do metabolismo de glicose e lipídios, já foi relatado em mecanismos de regulação de peso corporal em frangos e poedeiras (59). O mesmo tem expressão em órgãos como o coração, fígado, rim, baço, pulmão e também no intestino (60). Por possuírem funções metabólicas, a nível hormonal, a expressão dos genes pode ter contribuído na produção e metabolismo, principalmente em hormônios promotores da regulação mineral (10,58).

Neste trabalho buscou-se compreender através da análise de RNA-Seq, os mecanismos envolvidos na regulação e absorção de Ca e P em poedeiras com idade avançada, relacionando a expressão gênica com os diferentes

níveis de desempenho de características produtivas e a qualidade da casca dos ovos. Através das análises de expressão, foi possível destacar genes diferencialmente expressos atuando em processos referentes a regulação, e processos que podem também ser destacados como sendo subjacentes aos mecanismos de Ca e P. Entre muitos genes DE, destacam-se principalmente os genes *CAV1* e *CAB39L* com importante função na homeostasia de Ca. Os genes *FGF7*, *ILIRL1*, *MYLK*, *TNIP3*, *COLEC11* e *HAND2*, responsáveis por respostas do sistema imunológico. Nas respostas hormonais os genes *PTHLH*, *ESRRG*, *EMP* e *ADIPOQ* podem ter contribuído nas características de desempenho produtivo, por se tratarem de mediadores hormonais, sendo que o mecanismo de regulação mineral ocorre pela atuação de diferentes hormônios no organismo (10,15).

Portanto, através deste estudo, foi possível identificar genes diferencialmente expressos no duodeno, que podem ser candidatos a processos importantes para a regulação e absorção mineral em poedeiras com idade avançada. Destacamos principalmente genes enriquecidos em processos de homeostasia mineral, resposta hormonal. Além de processos relacionados a respostas do sistema imune, podendo ter contribuído nos índices de produção apresentados principalmente no grupo LP.

Conclusão

Foram identificados novos genes candidatos envolvidos em processos biológicos relacionados com Ca e P em poedeiras com idade avançada. Destacando-se principalmente *FGF7*, *ILIRL1*, *MYLK*, *TNIP3*, *COLEC11*, *HAND2*, *PTHLH*, *ESRRG*, *EMP* e *ADIPOQ*, envolvidos em processos de

homeostasia do cálcio, resposta hormonal e resposta imune.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo projeto #13.16.04.05.00.00 da Embrapa Centro Nacional de Pesquisa. LAS recebeu bolsa de estudos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). DEPM recebeu bolsa de estudos pela Embrapa Empresa Nacional de pesquisa em Suínos e Aves. MCL e FCT são bolsistas de produtividade do CNPq. Agradecemos a CAPES (Brasil – Código financeiro 001) pelo livre acesso aos artigos utilizados na revisão de literatura. Os autores agradecem Alexandre L. Tessmann pela assistência técnica.

Contribuição dos autores

Desenvolvimento do experimento: JOP MCL FCT.

Execução do experimento: LAS AMGI DEPM JOP MCL MAZN

Análise de dados: LAS AMGI JOP MCL AC FCT

Escrita – Preparação do rascunho original: LAS AMGI JOP MCL FCT

Escrita – Revisão e edição: LAS AMGI JOP MCL FCT

Aquisição do financiamento: FCT JOP

Supervisão e pesquisa: AMGI FCT

Interesses concorrentes

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Referências

1. Adedokun SA, Adeola O. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. *J Appl Poult Res* [Internet]. 2013;22(3):600–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2013-00740>
2. Ito DT, Faria DE de, Kuwano EA, Junqueira OM, Araujo LF de. Efeitos do fracionamento do cálcio dietário e granulometria do calcário sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Acta Sci Anim Sci*. 2006;28(2).
3. Li P, Wang R, Jiao H, Wang X, Zhao J, Lin H. Effects of dietary phosphorus level on the expression of calcium and phosphorus transporters in laying hens. *Front Physiol*. 2018;9(MAY):1–12.
4. Southard EB, Roff A, Fortugno T, Richie JP, Kaag M, Chinchilli VM, et al. Lead, calcium uptake, and related genetic variants in association with renal cell carcinoma risk in a cohort of male finnish smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(1):191–201.
5. Li X, Zhang D, Bryden WL. Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry: Are current diets formulated in excess? *Anim Prod Sci*. 2017;57(11):2304–10.
6. Buzinaro EF, De Almeida RNA, Mazeto GMFDS. Biodisponibilidade do cálcio dietético. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(5):852–61.
7. Bronner F. Intestinal calcium absorption: Mechanisms and applications. *J Nutr*. 1987;117(8):1347–52.
8. Al-Masri MR. Absorption and endogenous excretion of phosphorus in growing broiler chicks, as influenced by calcium and phosphorus ratios in feed. *Br J Nutr*. 1995;74(3):407–15.
9. Talmage R V., Mobley HT. Calcium homeostasis: Reassessment of the

- actions of parathyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2008;156(1):1–8.
10. Goff JP. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018;101(4):2763–813. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13112>
 11. Kebreab E, France J, Kwakkel RP, Leeson S, Darmani Kuhi H, Dijkstra J. Development and evaluation of a dynamic model of calcium and phosphorus flows in layers. *Poult Sci* [Internet]. 2009;88(3):680–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008-00157>
 12. Plaimast H, Kijparkorn S, Ittitanawong P. Effects of vitamin D3 and calcium on productive performance, egg quality and vitamin D3 content in egg of second production cycle hens. *Thai J Vet Med*. 2015;45(2):189–95.
 13. Carvalho LSS, Fernandes EA. Formação e qualidade da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. *Med Vet*. 2013;7(1):35–44.
 14. Robert JR. Factors Affecting Egg Internal Quality and Egg Shell Quality in Laying Hens. *J Poult Sci*. 2004;41(3):161–77.
 15. Hamdi M, López-Vergés D, Sign S, Manzanilla EG, Barroeta AC, Pérez JF. Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poult Sci*. 2015;94(9):2144–51.
 16. Yi G, Yuan J, Bi H, Yan W, Yang N, Qu L. In-depth duodenal transcriptome survey in chickens with divergent feed efficiency using RNA-seq. *PLoS One*. 2015 Sep 29;10(9).

17. Piórkowska K, Zukowski K, Połtowicz K, Nowak J, Ropka-Molik K, Derebecka N, et al. Identification of candidate genes and regulatory factors related to growth rate through hypothalamus transcriptome analyses in broiler chickens. *BMC Genomics*. 2020;21(1):1–12.
18. Gloux A, Le Roy N, Môme N, Piketty ML, Prié D, Benzoni G, et al. Increased expression of fibroblast growth factor 23 is the signature of a deteriorated Ca/P balance in ageing laying hens. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78106-7>
19. Mishra SK, Chen B, Zhu Q, Xu Z, Ning C, Yin H, et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with high rates of egg production in chicken hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8.
20. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. Tabela Brasileira para Aves e Suínos [Internet]. Vol. 2, Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 2005. p. 185. Available from: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Tabelas+brasileiras+-+Rostagno_000gy1tqvm602wx7ha0b6gs0xfzo6pk5.pdf%0Ahttp://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Tabelas+brasileiras+-+Rostagno_000gy1tqvm602wx7ha0b6gs0xfzo6pk5.pdf
21. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
22. Dobin A, Gingeras TR. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr Protoc Bioinforma*. 2015;51(1):11.14.1-11.14.19.

23. Smyth GK. limma: Linear Models for Microarray Data. *Bioinforma Comput Biol Solut Using R Bioconductor*. 2005;1(1):397–420.
24. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47.
25. Proszkowiec-Weglarz M, Angel R. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J Appl Poult Res [Internet]*. 2013;22(3):609–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2012-00743>
26. Hansen KK. Information To Users Umi. Kimberly K Hansen. 2002;13.
27. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):507–21.
28. Qin L, Zhu N, Ao BX, Liu C, Shi YN, Du K, et al. Caveolae and caveolin-1 integrate reverse cholesterol transport and inflammation in atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):1–17.
29. Frank PG, Pavlides S, Cheung MWC, Daumer K, Lisanti MP. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2008;295(1):242–8.
30. Pulito C, Mori F, Sacconi A, Goeman F, Ferraiuolo M, Pasanisi P, et al. Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities. *Cell Discov*. 2017;3.
31. Bian Y, Yang L, Zhao M, Li Z, Xu Y, Zhou G, et al. Identification of key genes and pathways in post-traumatic stress disorder using microarray analysis. *Front Psychol*. 2019;10(FEB):1–10.
32. Guo X, Wang Y, Chen Q, Yuan Z, Chen Y, Guo M, et al. The role of

- PtHLH in ovarian follicle selection, its transcriptional regulation and genetic effects on egg laying traits in hens. *Front Genet.* 2019;10(MAY):1–15.
33. Li YD, Liu X, Li ZW, Wang WJ, Li YM, Cao ZP, et al. A combination of genome-wide association study and selection signature analysis dissects the genetic architecture underlying bone traits in chickens. *Animal.* 2021;15(8).
 34. Tsai SM, Wang WP. Expression and function of fibroblast growth factor (FGF) 7 during liver regeneration. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(6):641–52.
 35. Medeiros A da C, Mota HJ da, Aires Neto T, Dantas Filho AM, Macedo LM de B, Melo NMC de. Efeitos do fator de crescimento de fibroblasto básico (FCFbeta) na cicatrização de anastomoses do esôfago. *Rev Col Bras Cir.* 2004;31(1):21–6.
 36. Huang T, Wang L, Dian L, Piao L, Xiong H, Zhuang L, et al. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1. *Int J Oncol.* 2017;50(5):1501–12.
 37. Peng C, Chen B, Kao HK, Murphy G, Orgill DP, Guo L. Lack of FGF-7 further delays cutaneous wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(6):11–4.
 38. Lyakhovich A, Aksenov N, Pennanen P, Miettinen S, Ahonen MH, Syvälä H, et al. Vitamin D induced up-regulation of keratinocyte growth factor (FGF-7/KGF) in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(2):675–80.
 39. Akhabir L, Sandford A. Genetics of Interleukin 1 Receptor-Like 1 in

- Immune and Inflammatory Diseases. *Curr Genomics*. 2010;11(8):591–606.
40. Schaunaman N, Sanchez A, Dimasuay G, Pavelka N, Numata M, Alam R. Interleukin 1 Receptor-Like 1 (IL1RL1) Promotes Airway Bacterial and Viral Infection and Inflammation. *Am Soc Microbiol*. 2019;87(7):1–8.
 41. Mascarenhas JB, Tchourbanov AY, Fan H, Danilov SM, Wang T, Garcia JGN. Mechanical stress and single nucleotide variants regulate alternative splicing of the mylk gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(1):29–37.
 42. Miller EJ, Epstein EH, Piez KA. Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;42(6):1024–9.
 43. Abrams J, Einhorn Z, Seiler C, Zong AB, Sweeney HL, Pack M. Graded effects of unregulated smooth muscle myosin on intestinal architecture, intestinal motility and vascular function in zebrafish. *DMM Dis Model Mech*. 2016;9(5):529–40.
 44. Savenije OE, Mahachie John JM, Granell R, Kerkhof M, Dijk FN, De Jongste JC, et al. Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(1):170–7.
 45. Xiang Q, Wang C, Zhang H, Lai W, Wei H, Peng J. Effects of different probiotics on laying performance, egg quality, oxidative status, and gut health in laying hens. *Animals*. 2019;9(12):1–6.
 46. Mishra B, Jha R. Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. *Front Vet Sci*. 2019;6(MAR):1–5.

47. Wang Y, Chen Q, Liu Z, Guo X, Du Y, Yuan Z, et al. Transcriptome analysis on single small yellow follicles reveals that Wnt4 is involved in chicken follicle selection. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8(NOV):1–14.
48. Onagbesan OM, Metayer S, Tona K, Williams J, Decuypere E, Bruggeman V. Effects of genotype and feed allowance on plasma luteinizing hormones, follicle-stimulating hormones, progesterone, estradiol levels, follicle differentiation, and egg production rates of broiler breeder hens. *Poult Sci* [Internet]. 2006;85(7):1245–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ps/85.7.1245>
49. Wysolmerski JJ. Parathyroid hormone-related protein: An update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):2947–56.
50. Potts JT. Parathyroid hormone: Past and present. *J Endocrinol*. 2005;187(3):311–25.
51. Bracco OL, Kayath MJ, Vieira JGH. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2003;47(3):285–91.
52. Guerreiro PM, Renfro JL, Power DM, Canario AVM. The parathyroid hormone family of peptides: Structure, tissue distribution, regulation, and potential functional roles in calcium and phosphate balance in fish. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(2).
53. Fan Y, Bi R, Densmore MJ, Sato T, Kobayashi T, Yuan Q, et al. Parathyroid hormone 1 receptor is essential to induce FGF23 production and maintain systemic mineral ion homeostasis. *FASEB J*. 2016;30(1):428–40.

54. Miao D, Li J, Xue Y, Su H, Karaplis AC, Goltzman D. Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology*. 2004;145(8):3554–62.
55. Anelli GM, Mandò C, Letizia T, Mazzocco MI, Novielli C, Lisso F, et al. Placental ESRRG-CYP19A1 expressions and circulating 17-Beta Estradiol in IUGR pregnancies. *Front Pediatr*. 2019;7:1–9.
56. Morais MRPT, De Souza Velho ALMC, Dantas SES, Fontenele-Neto JD. Morfofisiologia da reprodução das aves: Controle endócrino do ciclo sexual das aves. *Acta Vet Bras*. 2012;6(4):285–93.
57. Wistedt A, Ridderstråle Y, Wall H, Holm L. Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids. *Acta Vet Scand* [Internet]. 2019;61(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0449-1>
58. Yuan J, Liu W, Liu ZL, Li N. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping and expression analysis of ADIPOQ(adiponectin) in chicken. *Cytogenet Genome Res*. 2006;112(1–2):148–51.
59. Na W, Yu JQ, Xu ZC, Zhang XY, Yang LL, Cao ZP, et al. Important candidate genes for abdominal fat content identified by linkage disequilibrium and fixation index information. *Poult Sci* [Internet]. 2019;98(2):581–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey426>
60. Chen C, White DL, Marshall B, Kim WK. Role of 25-Hydroxyvitamin D3 and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Chicken Embryo Osteogenesis, Adipogenesis, Myogenesis, and Vitamin D3 Metabolism. *Front Physiol*. 2021;12:1–10.

Tabela suplementar 1. Médias e erro padrão das variáveis avaliadas de acordo com os tratamentos.

Tabela suplementar 2. Genes expressos no grupo G1 relação (22,43 Ca/P) e o G2 (6,71 Ca/P).

Tabela suplementar 3. Genes DE entre o G1 relação (22,43 Ca/P) e o G2 (6,71 Ca/P).

Tabela suplementar 4. Genes DE entre o G1 relação (22,43 Ca/P) e o GC relação (11,43 Ca/P).

Tabela suplementar 5. Genes DE entre o G1 relação (22,43 Ca/P) e o GC relação (11,43 Ca/P).

Tabela suplementar 6. Genes expressos no grupo GC relação (11,43 Ca/P) e o G2 relação (6,71 Ca/P).

Tabela suplementar 7. Anotação funcional dos genes DE, processos biológicos envolvidos.