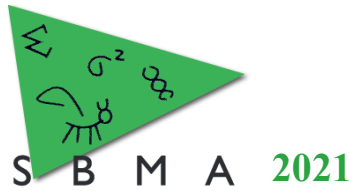


# XIV Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

18 a 19 de Outubro de 2021

*On-line*





### Expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo de cálcio e fósforo em poedeiras com diferentes níveis de desempenho

Letícia Alves Salmória<sup>1\*</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>1,2</sup>; Fernando de Castro Tavernari<sup>2,3</sup>; Jane de Oliveira Peixoto<sup>1,2</sup>; Débora Ester Petry Marcelino<sup>4</sup>, Mariane Spudeit Dal Pizzol<sup>3</sup>, Maurício Egídio Cantão<sup>2</sup>, Mônica Corrêa Ledur<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Guarapuava, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UDESC-Oeste, Chapecó, SC, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Concórdia FACC, Concórdia, SC, Brasil.

\*Autor correspondente: [letiasalmeria3@gmail.com](mailto:letiasalmeria3@gmail.com)

**Resumo:** Cálcio (Ca) e Fósforo (P) são minerais essenciais na nutrição de poedeiras, participam em muitas funções metabólicas e na formação da casca do ovo. Níveis inadequados desses elementos podem resultar em perdas significativas na qualidade dos ovos, vida produtiva e bem estar de poedeiras. Portanto, utilizando a técnica de RNA-Seq, objetivou-se analisar o perfil de expressão gênica relacionada a mecanismos homeostáticos de Ca e P fornecidos na dieta de poedeiras. Para isso, foram utilizadas 27 amostras do duodeno, de três grupos de poedeiras que receberam diferentes níveis na dieta de Ca:P e apresentaram diferentes desempenhos produtivos: alto (4.71% Ca e 0.21% P), baixo (3.29% Ca e 0.49% P) e grupo controle (Ca 4% e 0,35% P). Considerando todas as comparações entre os grupos, um total 107 genes foram diferencialmente expressos (DE, FDR < 0.05) no duodeno. Destes, pode-se destacar *FGF7*, *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI*, *PKIA*, *CAVI*, *COL3A1* e *TNIP3*. Nenhum desses havia sido previamente associado com a regulação de Ca:P na dieta de poedeiras. A identificação desses genes é importante para a melhor compreensão de mecanismos envolvidos na modulação e no uso eficiente desses minerais na dieta das galinhas.

**Palavras-chave:** galinha, RNA-Seq, transcriptômica.

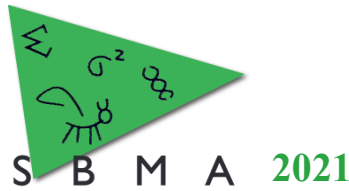
### Differential expression of genes related to calcium and phosphorus metabolism in laying hens with different performance levels

**Abstract:** Calcium (Ca) and phosphorus (P) are essential minerals in laying hens nutrition, participating in many metabolic functions, including eggshell formation. Inadequate levels of these elements can result in significant losses in egg quality, productive life and welfare of the laying hens. Therefore, using the RNA-Seq analysis, the gene expression profile related to Ca and P homeostatic mechanisms in the diet of laying hens was evaluated. To this, 27 duodenum samples from three groups of laying hens that received different levels of Ca:P in the diet and had different productive performances: high (4.71% Ca and 0.21% P), low (3.29% Ca and 0.49% P) and control group (Ca 4% and 0.35% P) were used. Considering all comparisons among groups, 107 genes were differentially expressed (DE, FDR < 0.05) in the duodenum. Of these, the *FGF7*, *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI*, *PKIA*, *CAVI*, *COL3A1* and *TNIP3* can be highlighted. None of them had been previously associated with Ca:P regulation. The identification of these candidate genes is important to improve the understanding of the mechanisms involved with the modulation and the efficient use of these minerals in the chicken diet.

**Keywords:** chicken, RNA-Seq, transcriptomics.

### Introdução

O cálcio (Ca) e o fósforo (P) são os principais minerais na nutrição de poedeiras, participando de muitos processos fisiológicos vitais, como na estruturação óssea e na formação da casca do ovo. No



entanto, suas funções são dependentes da quantidade disponível na dieta e as concentrações plasmáticas são controladas por mecanismos de reação do hormônio da paratireoide (PTH), vitamina D na sua forma ativa, e por seus respectivos receptores localizados no intestino delgado, ossos e rins. O antagonismo existente entre os minerais interfere na absorção, resultando em perdas na qualidade da casca do ovo, no desempenho produtivo e no bem-estar animal (Adedokun; Adeola, 2012). Através da nutrigenômica é possível analisar a influência da dieta na expressão gênica, compreendendo que não somente alguns nutrientes são essenciais, mas que as quantidades fornecidas na dieta também são importantes (Mutch et al., 2005). Diante disso, o objetivo do estudo foi analisar o perfil de expressão gênica no duodeno, que é um importante sítio de absorção desses minerais, em poedeiras que receberam diferentes níveis de Ca e P na dieta por um período de 50 semanas, por meio da análise de RNA-Seq.

#### Material e Métodos

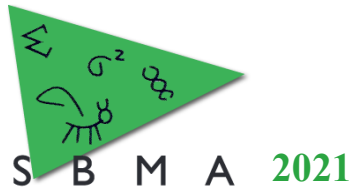
Foram utilizadas 27 poedeiras da linhagem Bovans White com 70 semanas de idade, que receberam diferentes níveis de Ca e P na dieta desde as 20 semanas de idade. Dos nove grupos submetidos às diferentes dietas, três foram escolhidos para a análise de RNA-Seq de acordo com o desempenho produtivo e características qualitativas dos ovos. Assim, foram utilizadas 9 amostras do duodeno do grupo que apresentou melhor desempenho produtivo (4.71% Ca e 0.21% P), 9 com pior (3.29% Ca e 0.49% P) e 9 amostras de um grupo controle, com níveis próximos do indicado usualmente: Ca 4% e 0,35% P. As amostras coletadas tiveram o RNA-total extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguida de *clean-up* com kit Qiagen RNeasy. Em seguida, o RNA foi quantificado com o equipamento Biodrop e a sua integridade foi avaliada em Bioanalyzer (Agilent 2012), considerando apenas valores de RIN > 8 para análises posteriores. O preparo das bibliotecas de RNA-Seq foi realizado com o kit Illumina Stranded (Illumina) e enviadas para sequenciamento em equipamento Illumina HiSeq 2500, seguindo o protocolo *paired-end* (2 x 100 pb). As sequências geradas foram submetidas ao controle de qualidade usando o software Trimmomatic e mapeadas contra o genoma referência da galinha (GRCg6a) com o software STAR. Para a análise estatística foi utilizado o método *voom* do pacote limma no programa R e os genes DE foram selecionados com base no nível de False Discovery Rate (FDR) < 0,05. A anotação funcional foi realizada no PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>).

#### Resultados e Discussão

Foram identificados 107 genes diferencialmente expressos (DE, FDR < 0.05) no duodeno, em resposta aos três diferentes níveis de Ca:P fornecidos na dieta. Entre o grupo de melhor e pior desempenho, 105 genes foram DE, sendo que 16 apresentaram funções em processos metabólicos de fósforo e regulação no transporte de íons de cálcio, destacando-se os genes *FGF7*, *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI*, *PKIA*, *COL3A1* e *CAVI* que foram menos expressos no grupo de melhor desempenho. Dois genes foram DE entre o grupo melhor e o controle, sendo *TNIP3* superexpresso e o *ENSGALG00000051077* menos expresso no grupo de melhor desempenho. Nenhum gene foi DE entre os grupos pior e controle.

Genes como *MYLK*, *CAB39L*, *ILIRLI* e *TNIP3* já foram relatados com funções anti-inflamatórias intestinais e sob condições de estresse em diferentes espécies animais (Abrams et al., 2016, Savenije., et al 2014). O gene *COL3A1* é considerado um dos principais colágenos constituintes na integridade do intestino, atuando junto com outros colágenos na cicatrização tecidual (Miller et al., 1971). Desse modo, a maior expressão destes genes no grupo de pior desempenho em relação ao melhor pode estar associada a respostas imunes desencadeadas para possível tentativa de manutenção da mucosa intestinal, podendo ter contribuído para que este grupo apresentasse menor desempenho produtivo.

O gene *PKIA*, relacionado à inibição da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), estimula a conversão da vitamina D ativa (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) que realiza a absorção intestinal de Ca. Esse estímulo é dependente das concentrações plasmáticas de Ca, que quando em baixa concentração, sua forma ativa é



sintetizada para maior absorção de cálcio no duodeno. A ativação dessa via da proteína kinase pelo PTH também leva a um aumento na reabsorção de Ca nos túbulos renais (Proszkowiec-Weglarz et al., 2013). Dessa forma, o grupo que obteve o melhor desempenho, apresentou menor expressão de *PKIA*, podendo estar associado com a maior disponibilidade de cálcio na dieta, não dependendo de mecanismos compensatórios na regulação de cálcio.

O *VDR* é considerado o principal receptor da vitamina D, que possibilita rápida absorção de Ca no intestino delgado. Trabalhos já mostraram que a estreita associação do receptor *VDR* com membranas enriquecidas com caveolina, codificada pelo gene *CAVI*, ligadas por meio da vitamina D, apresentaram maior afinidade na mucosa intestinal, resultando em maiores respostas de transporte de cálcio em frangos (Proszkowiec-Weglarz., et al, 2013). O gene *FGF7*, também já foi relacionado a funções de regulação de Ca por meio da vitamina D, além de participar em funções conhecidas no metabolismo de P (Oliveira., et al 2010). Portanto, a superexpressão dos genes *CAVI* e *FGF7* no grupo de menor desempenho pode estar relacionada a maiores respostas no transporte ativo de íons de Ca, pela baixa concentração plasmática, resultando em maior necessidade de captação de cálcio pelo duodeno.

#### Conclusão

Foram identificados novos genes candidatos relacionados a regulação da absorção de cálcio e fósforo em poedeiras submetidas a diferentes dietas. A variação na expressão desses genes envolvidos na homeostasia Ca:P em decorrência das dietas com diferentes níveis de Ca e P pode ter influenciado o desempenho das poedeiras.

#### Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo projeto EMBRAPA 13.16.04.005.00.00. Os autores LAS e DEPM agradecem a CAPES e CNPq/ PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, respectivamente, pela concessão de bolsa. Os autores FCT e MCL agradecem ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

#### Literatura citada

Abrams, J., Einhorn, Z., Seiler, C., Zong, A. B., Sweeney, H. L., & Pack, M. (2016). Graded effects of unregulated smooth muscle myosin on intestinal architecture, intestinal motility and vascular function in zebrafish. *Disease models & mechanisms*, 9(5), 529-540.

Adedokun, S. A., Adeola. 2012. O. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. **Poultry Science Association**, 600 – 608.

Kuivaniemi, H., & Tromp, G. (2019). Type III collagen (COL3A1): gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, 707, 151-171.

Miller, E. J., Epstein Jr, E. H., & Piez, K. A. (1971). Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. *Biochemical and biophysical research communications*, 42(6), 1024-1029.

Oliveira, Rodrigo B., MOYSÉS, R. M. A. 2010. FGF-23: estado da arte. **Brazilian Journal of Nephrology**, 32, 323-331.

Proszkowiec-Weglarz, M., & Angel, R. (2013). Calcium and phosphorus metabolism in broilers: effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 609-627.

Savenije, O. E., John, J. M. M., Granell, R., Kerkhof, M., Dijk, F. N., de Jongste, J. C., Koppelman, G. H. (2014). Association of IL33–IL-1 receptor–like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 170-177.