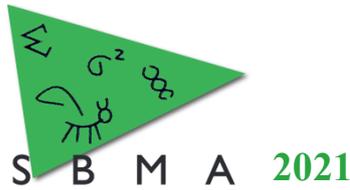


# XIV Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

18 a 19 de Outubro de 2021

*On-line*





### Expressão de genes candidatos no rim de poedeiras submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio e fósforo

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>, Karine Daenquele Silva Pinto<sup>5</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.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São João del Rei, São João del Rei - MG, Brasil.

\*Autor correspondente: [letiasalmoria3@gmail.com](mailto:letiasalmoria3@gmail.com)

**Resumo:** Os mecanismos de regulação de cálcio (Ca) e fósforo (P) ocorrem pela interação de hormônios, absorção intestinal, reabsorção óssea e excreção renal, e seu entendimento é essencial para que dietas mais adequadas sejam fornecidas a poedeiras. Sabendo que o rim é um órgão importante na regulação plasmática de Ca e P, o perfil de expressão de genes candidatos no rim de poedeiras com 70 semanas de idade submetidas a dietas com diferentes níveis de Ca e P foi avaliado utilizando a técnica de qPCR. Para isso, 30 amostras de rim foram submetidas a análise de expressão relativa para cinco genes candidatos (*CALM2*, *CALB1*, *PTH*, *TRPV6* e *CYP24A1*). O gene *PTH* foi super expresso no grupo G1 (4.71% Ca e 0.21% P) em relação ao G2 (3.29% Ca e 0.49% P) e o gene *CYP24A1* foi menos expresso no G2 em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). Os genes *CYP24A1* e *PTH* foram diferencialmente expressos no rim de poedeiras com 70 semanas de idade submetidas a diferentes níveis de Ca e P nas dietas, sugerindo que há um mecanismo adaptativo e compensatório que pode auxiliar a manutenção de taxas de postura e qualidade da casca do ovo em idades mais tardias.

**Palavras-chave:** qPCR, galinha, metabolismo, minerais

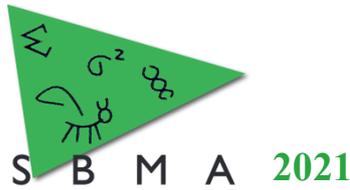
### Candidate gene expression in kidney of laying hens submitted to different levels of calcium and phosphorus in the diet

**Abstract:** Calcium (Ca) and phosphorus (P) regulation occur through hormones, intestinal absorption, bone resorption and renal excretion interactions, and their understanding is essential to formulate adequate diets for laying hens. Knowing that the kidney is one of main organs in the Ca and P homeostasis, candidate gene expression in the kidney of 70-week-old laying hens fed different Ca and P levels in the diet was evaluated through qPCR analysis. To this, 30 kidney samples were submitted to relative expression analysis for five candidate genes (*CALM2*, *CALB1*, *PTH*, *TRPV6* e *CYP24A1*). The *PTH* gene was upregulated in the G1 (4.71% Ca e 0.21% P) compared to G2 (3.29% Ca e 0.49% P), and the *CYP24A1* gene was downregulated in the G2 compared to the control group ( $p \leq 0,05$ ). The *CYP24A1* e *PTH* were differentially expressed in the kidney of 70-week-old laying hens submitted to different Ca and P levels in the diets, suggesting that there is a compensatory and adaptive which could help maintain egg production rate and eggshell quality at later ages.

**Keywords:** qPCR, chickens, metabolism, minerals

### Introdução

Os minerais são essenciais para a vida produtiva de poedeiras, sendo que os principais são o cálcio e fósforo, que realizam funções importantes na formação óssea e da casca do ovo. Após o pico de postura, a produção de ovos tende a diminuir, bem como a absorção dos minerais pelas aves. Além disso, relações inadequadas de Ca e P contribuem de forma significativa na diminuição da produção e perdas na qualidade da casca (Adedokun; Adeola, 2012). Um dos principais desafios está baseado no balanço adequado de Ca e P, devido à correlação dependente entre eles. Diante disso, o fornecimento adequado destes minerais tornou-se um desafio para a otimização da dieta de poedeiras. Além disso, os mecanismos de regulação destes minerais ocorrem pela interação de hormônios, absorção intestinal,



reabsorção óssea e excreção renal, sendo que o rim pode ser considerado um órgão fundamental base na regulação plasmática de Ca e P (Brown et al., 2005).

A influência dos níveis dietéticos na produção animal pode alterar o perfil de expressão de genes com funções relacionadas a vias metabólicas, de modo que é possível analisar e quantificar a variação da expressão de genes candidatos entre diferentes grupos avaliados (Arya et al., 2005) visando melhorar o entendimento da fisiologia destes animais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes candidatos responsáveis por atuar no metabolismo de Ca e P no rim de poedeiras com 70 semanas de idade submetidas a dietas com diferentes níveis de Ca e P utilizando a técnica de PCR quantitativa (qPCR).

#### Material e Métodos

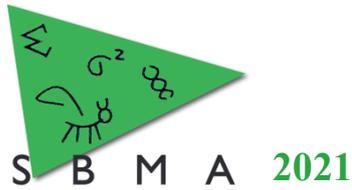
Foram utilizadas 30 amostras do rim de poedeiras da linhagem Bovans White, com 70 semanas de idade, que receberam diferentes níveis de Ca e P na dieta por um período de 50 semanas, sendo eles: 1) 4.71% Ca e 0.21% P (G1), 2) 3.29% Ca e 0.49% P (G2) e 3) um grupo controle (C), com níveis próximos ao utilizado usualmente nas dietas (Ca 4% e 0,35% P). As amostras de rim foram coletadas, submetidas a extração de RNA total utilizando o protocolo de Trizol (Invitrogen), seguido pela purificação em coluna de sílica com kit Qiagen RNEasy (Qiagen). O cDNA foi sintetizado com o kit Go Script Reverse Transcriptase (Promega), a partir de 3µg de RNA total, seguindo as recomendações do fabricante. Primers para os genes alvos: *Calmodulin 2 (CALM2)*, *Calbindin 1 (CALB1)*, *Parathyroid hormone (PTH)*, *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6)* e *Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (CYP24A1)* foram desenhados em junções de éxons no programa Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas, na condição de ciclagem: 95° por 2 min, 40 ciclos de 15s a 95° C e 30s a 60° C em equipamento Quantstudio 6 (Thermo Fischer Scientific). A média do *cycle threshold (Ct)* foi obtida e a análise estatística realizada no programa REST para comparação entre os grupos estudados. Os genes *RPL5* e *RPL30* foram usados como referência. Genes foram considerados diferencialmente expressos (DE) quando  $p \leq 0,05$ .

#### Resultados e Discussão

Neste trabalho, 5 genes descritos na literatura como envolvidos na regulação dos mecanismos de cálcio e fósforo foram analisados. Na comparação entre os grupos tratados com diferentes níveis de Ca e P fornecidos na dieta, o gene *CYP24A1* foi aproximadamente 5 vezes menos expresso no grupo G2 em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1) e o gene *PTH* foi 2 vezes mais expressos no G1 (relação Ca:P de 22%) em relação ao G2 (relação Ca:P de 6,7%).

O mecanismo de absorção de cálcio e fósforo ocorre principalmente com a ativação da vitamina D no fígado, rins e intestino. Em concentrações plasmáticas baixas de Ca e P, a vitamina D (25(OH)D) é hidroxilada tornando-se ativa (1,25-(OH)2D3), sendo absorvida de forma mais rápida no intestino, devido ao sinergismo com a regulação do paratormônio (PTH) (Jones et al., 2012). O gene *CYP24A1* atua no processo de inativação da vitamina D, estando presente nos rins e intestino. Este processo de inativação é essencial para a regulação dos níveis de vitamina D e homeostase da regulação do cálcio (Jones et al., 2012). Os níveis reduzidos de *CYP24A1* no G2 podem estar associados a um mecanismo de compensação de absorção mineral utilizando vitamina D. Desta forma, a menor expressão do *CYP24A1* no G2 pode indicar a necessidade de aumentar a absorção de cálcio mediada por vitamina D, dado que este grupo tinha menor nível de cálcio na dieta. Diferenças na expressão do *CYP24A1* já foram observadas em poedeiras em diferentes períodos de produção. No entanto, não há informação do perfil de expressão dos genes avaliados neste trabalho em estágios mais tardios de postura.

Já o *PTH* (hormônio da paratireoide), que foi super expresso no G1 em comparação ao G2, atua na absorção de Ca e P por meio da atividade óssea. Na ausência de PTH há perda de Ca via urina e mau funcionamento dos rins, podendo levar a má formação da casca do ovo (Ahmand & Balander, 2003). Em poedeiras, os níveis de PTH no sangue se mantêm elevados principalmente durante a fase de calcificação do ovo. Desta forma, a secreção hormonal para a regulação da absorção de Ca e P ocorre constantemente no organismo, em atividades compensatórias, quando os níveis na dieta não são adequados, gerando



hipofosfatemia e hipocalcemia, e principalmente mobilizando os minerais para a calcificação da casca do ovo (Ahmand & Balander, 2003).

Os genes *TRPV6* e *CALB1* atuam na codificação de proteínas que funcionam como canais de cálcio e transporte de íons, em associação com a calmodulina. *CALM2* pertence a família membro das calmodulinas que desempenha papel importante nas vias de sinalização de cálcio (Berridge et al., 2003). Entretanto, apesar da participação dos genes *TRPV6*, *CALB1* e *CALM2* no metabolismo de Ca e P, estes não foram diferencialmente expressos no rim de poedeiras com 70 semanas de idade, diante os diferentes níveis de cálcio e fósforo fornecidos na dieta.

#### Conclusão

Os genes *CYP24A1* e *PTH* foram diferencialmente expressos no rim de poedeiras com 70 semanas de idade submetidas a diferentes níveis de Ca e P na dieta. Estes resultados sugerem que há um mecanismo adaptativo e compensatório que pode auxiliar a manutenção de taxas de postura e qualidade da casca do ovo em idades mais tardias.

#### Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela EMBRAPA (13.16.04.005.00.00). LAS e DEPM agradecem a CAPES e ao CNPq/PIBIC, respectivamente, pela concessão de bolsa. FCT e MCL são bolsistas PQ/CNPq. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES (Financiamento 001).

#### Literatura citada

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

Ahmad, H. A., & Balander, R. J. (2003). Alternative feeding regimen of calcium source and phosphorus level for better eggshell quality in commercial layers. **Journal of applied poultry research**, 12, 509-514.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, 5(2), 209-219.

Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, 4(7), 517-529.

Brown, A. J., Krits, I., & Armbrecht, H. J. (2005). Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. **Archives of biochemistry and biophysics**, 437(1), 51-58.

Jones, G., Prosser, D. E., & Kaufmann, M. (2012). 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (*CYP24A1*): its important role in the degradation of vitamin D. **Archives of biochemistry and biophysics**, 523, 9-18.