

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

THIAGO DOS SANTOS ANDRADE

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL
GLICOSÍDEO EM FRANGOS DE CORTE PROVENIENTES DE MATRIZES DE
DIFERENTES IDADES SUPLEMENTADAS COM O MESMO ADITIVO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
***CAMPUS* DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

THIAGO DOS SANTOS ANDRADE

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL
GLICOSÍDEO EM FRANGOS DE CORTE PROVENIENTES DE MATRIZES DE
DIFERENTES IDADES SUPLEMENTADAS COM O MESMO ADITIVO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Área de concentração em “Produção e Nutrição Animal” para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2025

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Andrade, Thiago dos Santos

Efeitos da suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo em frangos de corte provenientes de matrizes de diferentes idades suplementadas com o mesmo aditivo / Thiago dos Santos Andrade; orientador Ricardo Vianna Nunes. -- Marechal Cândido Rondon, 2025.

159 p.

Tese (Doutorado Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2025.

1. Matrizes. 2. Frangos de corte. 3. Vitamina D. 4. Genes.
I. Nunes, Ricardo Vianna , orient. II. Título.

THIAGO DOS SANTOS ANDRADE

Efeitos da suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo em frangos de corte provenientes de matrizes de diferentes idades suplementadas com o mesmo aditivo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Doutor em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-Ruminantes / Aquicultura”, APROVADO pela seguinte Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 RICARDO VIANNA NUNES
Data: 13/05/2025 13:11:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador / Presidente – Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

CINTHIA
EYNG:04382284996
Assinado de forma digital por
CINTHIA EYNG:04382284996
Dados: 2025.05.13 13:43:45 -0300

Membro – Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Documento assinado digitalmente
 NILTON ROHLOFF JUNIOR
Data: 13/05/2025 13:53:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro – Prof. Dr. Nilton Rohloff Junior
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Documento assinado digitalmente
 ARELE ARLINDO CALDERANO
Data: 13/05/2025 14:06:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro – Prof. Dr. Arele Arlindo Calderano
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Documento assinado digitalmente
 JOSE GERALDO DE VARGAS JUNIOR
Data: 13/05/2025 15:38:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro – Prof. Dr. José Geraldo de Vargas Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Marechal Cândido Rondon, 6 de maio de 2025.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e pela oportunidade de poder realizar coisas incríveis.

A minha mãe, Elaine Timoteo dos Santos Andrade que sempre acreditou em mim e me apoiou em todos os momentos da minha vida.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em especial ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade. Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes por dar todo o suporte e orientação durante todo o meu período acadêmico, sempre acreditando no meu potencial.

Ao Dr. Nilton Rohloff Junior pela paciência, dedicação em compartilhar conhecimento e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Júlio Cesar Queiroz, por me apoiar incondicionalmente e, acima de tudo, por me dar a força e a determinação necessárias para seguir nessa jornada.

A Ana Paula Guimarães Cruz Costa, Bárbara Amanda Bebbber e a Gabrieli Toniazzi pela amizade sincera e por estar sempre ao meu lado, oferecendo apoio nos momentos em que mais precisei e por tornar meus dias na pós-graduação mais leves e felizes.

A todos os colegas e amigos do grupo GEMADA que me auxiliaram nas escalas de trabalho, análises laboratoriais, enfim toda e qualquer ajuda prestada, meu muito obrigado.

Aos funcionários dos laboratórios e da fazenda experimental por sempre estarem dispostos a ajudar. E todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram com o meu trabalho.

Muito obrigado!

Efeitos da suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo em frangos de corte provenientes de matrizes de diferentes idades suplementadas com o mesmo aditivo

RESUMO

Em todos os ensaios foram utilizados 1.152 pintos Ross 308 AP, distribuídos em um delineamento fatorial 2×3 , considerando a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes (0 ou 100 mg/kg) e diferentes níveis de suplementação nos frangos (0, 50 e 100 mg/kg) até os 21 dias de idade. No ensaio I (Matrizes de 30 semanas de idade) a histomorfometria intestinal e a expressão gênica foram analisadas aos 21 dias, enquanto a discondroplasia tibial foi avaliada aos 42 dias. Os frangos provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ apresentaram maior peso ao nascimento, menor conversão alimentar, histomorfometria intestinal e maior rendimento de carcaça. No entanto, essa suplementação não aumentou a deposição de cálcio e fósforo na tíbia, resultando em menor resistência óssea. No ensaio II (Matrizes de 46 semanas de idade) a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes gerou frangos de corte mais pesados ao nascimento e com melhor saúde óssea aos 21 dias, com maior deposição de cálcio e fósforo e maior resistência a quebra tíbia. Além disso, aumentou a expressão de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1β no jejuno. Os frangos de corte suplementados com 50 mg kg⁻¹ apresentaram maior deposição de fósforo na tíbia, enquanto aqueles que receberam 50 ou 100 mg kg⁻¹ tiveram maiores níveis de interleucina 10 quando provenientes de matrizes suplementadas. No ensaio III (Matrizes de 46 semanas de idade) a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes resultou em frangos de corte mais pesados ao nascimento e com maior altura de vilosidade, maior área de absorção e maior relação vilo:cripta no jejuno aos 42 dias de idade. Além disso, estes frangos de corte apresentaram menor concentração sérica de cálcio, maior deposição de cálcio e fósforo na tíbia, maior resistência à quebra da tíbia e maior expressão de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1β aos 42 dias, quando provenientes das matrizes suplementadas com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Enquanto, a inclusão de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte promoveu maior ganho de peso e melhor resposta imune aos 42 dias de idade. No ensaio IV (Matrizes de 62 semanas de idade) as matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ resultaram em frangos de corte mais pesados ao nascimento, melhor conversão alimentar e maiores concentrações de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1β aos 21 dias de idade. No ensaio V (Matrizes de 62 semanas de idade) a suplementação com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes proporcionou frangos de corte mais pesados ao nascimento e com menores níveis de lesões de discondroplasia tibial e maiores níveis de calbindinas D28K, interleucina 10 e interleucina 1β ao atingirem 42 dias de idade. Além disso, frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ durante o crescimento apresentam menor conversão alimentar, menor profundidade de cripta, maior altura do vilo, maior área de absorção, maior relação vilo:cripta e maior expressão gênica de interleucina 10 e interleucina 1β aos 42 dias de idade. Os resultados de interação entre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes e dos frangos de corte demonstrou que frangos de corte, quando provenientes de matrizes suplementadas, apresentam maiores níveis de fosfatase alcalina, interleucina 10 e interleucina 1β quando suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ aos 42 dias de idade. Conclui-se que a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes resultou, de forma consistente, em frangos de corte mais pesados ao nascimento. No entanto, os efeitos sobre o crescimento dos frangos de corte variaram conforme a idade das matrizes e o nível de suplementação nos frangos de corte. Portanto, a inclusão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte durante a fase de crescimento trouxe benefícios pontuais, como melhor resposta imune e desenvolvimento intestinal, mas nem sempre resultou em ganhos expressivos de desempenho ou resistência óssea. Dessa forma, a suplementação nas matrizes se mostrou uma estratégia viável para otimizar o desenvolvimento inicial dos frangos de corte, enquanto a suplementação na fase de crescimento dos frangos de corte precisa ser avaliada com cautela para determinar sua real efetividade e custo-benefício na produção.

Palavra-chave: avicultura, desempenho, genes, matrizes.

Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol glucoside supplementation in broiler chickens from hens of different ages supplemented with the same additive.

ABSTRACT

A total of 1,152 Ross 308 AP chicks were used in all trials, distributed in a 2×3 factorial design, considering 1,25(OH)₂D₃-G supplementation in breeder hens (0 or 100 mg/kg) and different supplementation levels in broilers (0, 50, and 100 mg/kg) up to 21 days of age. In Trial I (30-week-old breeders), intestinal histomorphometry and gene expression were evaluated at 21 days, while tibial dyschondroplasia was assessed at 42 days. Broilers from breeders supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G showed higher hatch weight, better feed conversion, improved intestinal histomorphometry, and higher carcass yield. However, this supplementation did not increase calcium and phosphorus deposition in the tibia, resulting in lower bone strength. In Trial II (46-week-old breeders), 1,25(OH)₂D₃-G supplementation in breeders led to heavier broilers at hatch and better bone health at 21 days, with higher calcium and phosphorus deposition and greater tibial breaking strength. Additionally, it increased the expression of calbindin D28K, interleukin 10 (IL-10), and interleukin 1 β (IL-1 β) in the jejunum. Broilers supplemented with 50 mg/kg had greater phosphorus deposition in the tibia, while those receiving 50 or 100 mg/kg showed higher IL-10 levels when derived from supplemented breeders. In Trial III (46-week-old breeders), supplementation of 1,25(OH)₂D₃-G in breeders resulted in broilers with higher hatch weight, increased villus height, greater absorption area, and a higher villus:crypt ratio in the jejunum at 42 days. These broilers also had lower serum calcium concentration, greater calcium and phosphorus deposition in the tibia, greater tibial breaking strength, and increased expression of calbindin D28K, IL-10, and IL-1 β at 42 days of age when derived from breeders supplemented with 100 mg/kg. Furthermore, broiler supplementation with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G promoted greater weight gain and improved immune response at 42 days. In Trial IV (62-week-old breeders), supplementation with 1,25(OH)₂D₃-G resulted in broilers with higher hatch weight, better feed conversion, and increased levels of calbindin D28K, IL-10, and IL-1 β at 21 days. In Trial V (62-week-old breeders), maternal supplementation with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G led to broilers with higher hatch weight, fewer tibial dyschondroplasia lesions, and increased expression of calbindin D28K, IL-10, and IL-1 β at 42 days. Additionally, broilers supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G during the growth phase exhibited improved feed conversion, reduced crypt depth, increased villus height, larger absorption area, higher villus:crypt ratio, and increased expression of IL-10 and IL-1 β at 42 days. The interaction between breeder and broiler supplementation demonstrated that broilers from supplemented breeders had higher levels of alkaline phosphatase, IL-10, and IL-1 β when also supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G at 42 days. In conclusion, 1,25(OH)₂D₃-G supplementation in breeders consistently resulted in heavier broilers at hatch. However, the effects on broiler growth varied depending on breeder age and supplementation levels during the growth phase. Therefore, while supplementation in breeders proved to be a viable strategy to enhance early broiler development, supplementation during the broiler growth phase should be carefully evaluated to determine its actual effectiveness and cost-benefit in production.

Keywords: poultry, performance, genes, breeders.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
Fontes de vitamina D ₃ para dieta de frangos de corte	11
Concentrações ideais de vitamina D ₃	14
Metabolismo da vitamina D ₃ (colecalfiferol) em frangos de corte	16
Metabolismo de 1,25-Dihidroxicolecalciferol-glicosídeo em frangos de corte	17
1,25(OH) ₂ D ₃ -Glicosídeo de Solanum glaucophyllum: Origem e composição	18
Função de 1,25(OH) ₂ D ₃ -Glicosídeo no intestino de frangos de corte	19
Contribuições do 1,25(OH) ₂ D ₃ para a mineralização óssea	24
Impacto do ganho de peso no sistema locomotor de frangos de corte	26
Papel de 1,25(OH) ₂ D ₃ na modulação da resposta imune.....	28
Peptídeos relacionados ao hormônio paratireoide (PTH) e 1,25(OH) ₂ D ₃	30
Calcitonina e 1,25(OH) ₂ D ₃	32
REFERÊNCIAS	33
1,25-DIHIIDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO (1,25(OH)₂D₃-G) NA DIETA DE MATRIZES E SUA INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE FRANGOS DE CORTE	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAIS E MÉTODOS	43
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	61
MATRIZES COM 46 SEMANAS DE IDADE SUPLEMENTADAS COM 1,25(OH)₂D₃-G PRODUZEM PINTOS MAIS PESADOS AO NASCIMENTO, COM MELHOR SAÚDE ÓSSEA E IMUNIDADE AOS 21 DIAS DE IDADE.....	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAIS E MÉTODOS	68
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	80
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM GLICOSÍDEO DE 1,25- DIHIIDROXICOLECALCIFEROL, ORIUNDOS DE MATRIZES COM 46 SEMANAS DE IDADE, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM O MESMO ADITIVO.	84
INTRODUÇÃO	85
MATERIAIS E MÉTODOS	87
RESULTADOS	93
DISCUSSÃO	100

CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	103
1,25-DIHIIDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO EM DIETAS DE MATRIZES E FRANGOS DE CORTE.....	108
INTRODUÇÃO	109
MATERIAIS E MÉTODOS	110
RESULTADOS	117
DISCUSSÃO	121
CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS	123
1,25-DIHIIDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NAS DIETAS DE MATRIZES E FRANGOS DE CORTE	129
INTRODUÇÃO	131
MATERIAIS E MÉTODOS	132
RESULTADOS	140
DISCUSSÃO	149
CONCLUSÃO	154
REFERÊNCIAS	154

INTRODUÇÃO

A vitamina D₃ é reconhecida como um aditivo alimentar essencial para otimizar o desenvolvimento e crescimento de frangos de corte (Liao et al., 2017; Vieites et al., 2017, 2018). A suplementação com sua forma bioativa, 1,25(OH)₂D₃, tem mostrado facilitar o transporte de cálcio (Ca) e fósforo (P) no duodeno e jejuno das aves (Vieites et al., 2014; Castro et al., 2018; Souza et al., 2020). Ao contrário da vitamina D convencional, esta molécula contorna o processo metabólico de hidroxilação no fígado e rins, permitindo que ela atue diretamente no intestino (Dimitrov et al., 2021; Hsiao et al., 2018).

Além disso, algumas fontes herbais, como o *Solanum glaucophyllum*, contêm esta substância na forma glicosídica, o que pode oferecer uma ação prolongada no intestino e melhorar sua eficácia como suplemento dietético (Cheng et al., 2004; Vieites et al., 2016; Zanuzzi et al., 2012). Estudos recentes destacaram que a suplementação com 1,25(OH)₂D₃ leva a um aumento significativo na expressão de mRNA dos transportadores de Ca e P (Souza & Vieites, 2014; Aye Cho et al., 2020).

Essa estimulação resulta em maior absorção de Ca no intestino proximal, particularmente no duodeno e jejuno, promovendo melhorias notáveis no desempenho e na mineralização óssea (Alharbi et al., 2025; Cao et al., 2021; B. Wang et al., 2022). Além disso, observou-se melhorias nas respostas imunes, evidenciadas pelo aumento da expressão dos genes de interleucinas e concentrações de anticorpos, imunoglobulina intestinal e células T no sangue (Geng et al., 2018; Jaime et al., 2020; Kumar et al., 2023).

No entanto, a suplementação com 1,25(OH)₂D₃ ainda é uma prática que carece de padronização (Alves et al., 2018; Chen et al., 2021). Apesar das diretrizes fornecidas pelas tabelas brasileiras para aves e suínos, as concentrações de inclusão continuam sendo uma área em evolução (Masuyama et al., 2006; Rousseau et al., 2016; Cao et al., 2021). A falta de precisão pode levar a problemas relacionados à deficiência ou excesso de vitamina, resultando em doenças e perdas econômicas na indústria avícola (Alves et al., 2018; Vieites et al., 2016).

Nesse contexto, a presente revisão desempenha um papel vital na expansão do entendimento sobre a suplementação com 1,25(OH)₂D₃ sintético e herbal nas dietas de frangos de corte. Ao investigar de forma abrangente os efeitos desse composto sobre aspectos de crescimento, saúde e imunidade, esta revisão visa preencher lacunas científicas e fornecer perspectivas abrangentes para pesquisas futuras.

REVISÃO DE LITERATURA

Fontes de vitamina D₃ para dieta de frangos de corte

Existem diversas fontes de vitamina D₃ disponíveis no mercado para suplementação na dieta de frangos de corte, sendo essenciais para garantir o adequado metabolismo de cálcio e fósforo, além de influenciar o desenvolvimento ósseo e o desempenho geral dos animais (Babazadeh et al., 2022; Shojadoost et al., 2021, 2015). A seguir, apresento as principais fontes de vitamina D₃ que podem ser utilizadas na formulação de dietas para frangos de corte.

O colecalciferol é a forma inicial e não ativa da vitamina D₃, pode ser obtido de várias fontes, tanto naturais quanto sintéticas. As fontes naturais incluem o óleo de fígado de peixe, lanolina e outros produtos de origem animal (Brito et al., 2010; Oliveira et al., 2015; Setiyaningsih et al., 2023). Já as fontes sintéticas, produzidas a partir da lanolina ou por processos de fermentação, são amplamente utilizadas em rações comerciais de frangos de corte devido ao seu custo mais baixo e maior estabilidade (Shojadoost et al., 2015, 2021).

Apesar de sua importância, o colecalciferol, por si só, não exerce um efeito biológico direto significativo. Sua principal função é atuar como precursor para os metabolitos ativos, que regulam o metabolismo de cálcio e fósforo (Taghizadeh et al., 2024; Wei et al., 2024). Entre os pontos positivos do colecalciferol, destaca-se sua acessibilidade e custo, sendo uma das formas mais baratas e amplamente utilizadas de vitamina D₃ (Jabbar et al., 2024; Taghizadeh et al., 2024). No entanto, um ponto negativo do colecalciferol é sua dependência da conversão no fígado e nos rins em seus metabolitos ativos (25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃) (Starkey, 2024; Martins et al., 2025). Essa conversão pode ser afetada por fatores como a saúde renal, o que pode reduzir sua eficácia em situações em que essa conversão é comprometida (Jabbar et al., 2024; Starkey, 2024; Martins et al., 2025).

O 25-hidroxicolecalciferol (também conhecido como calcidiol) é o primeiro metabólito ativo formado após a ingestão de colecalciferol (Shi et al., 2024; Bassi et al., 2025). Sua produção ocorre no fígado, onde a enzima 25-hidroxilase catalisa a conversão do colecalciferol em 25-hidroxicolecalciferol, que é a principal forma circulante da vitamina D₃ no sangue (T.S.B. Lopes et al., 2024; Martins et al., 2025). O calcidiol, atua na manutenção dos níveis adequados de vitamina D₃ no organismo. Entre os pontos positivos do 25(OH)D₃, destaca-se sua capacidade de servir como um excelente indicador dos níveis de vitamina D₃ no organismo (Shojadoost et al., 2015, 2021). Isso o torna um marcador eficaz para avaliar a adequação da suplementação de vitamina D₃, permitindo ajustes conforme necessário para garantir que os níveis estejam dentro da faixa ideal (Upadhaya et al., 2022). Além disso, por ser a forma

circulante e relativamente estável da vitamina D₃, o 25(OH)D₃ é uma boa opção para garantir uma oferta constante de vitamina D₃ ao longo do tempo, o que facilita o controle dos níveis de vitamina D₃ no sangue de maneira eficiente (Lopes et al., 2024; Bassi et al., 2025).

Por outro lado, o 25(OH)D₃ possui menor atividade biológica em comparação com o 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃), a forma mais ativa da vitamina D₃. O 25(OH)D₃ não exerce ações diretas sobre a absorção de cálcio e fósforo, funções vitais para a mineralização óssea e o metabolismo de minerais essenciais (Shojadoost et al., 2015, 2021). Para que o 25(OH)D₃ possa exercer essas funções, ele precisa ser convertido nos rins em 1,25(OH)₂D₃, o que significa que seu efeito biológico é indireto e depende dessa conversão para ter impacto nas funções fisiológicas relacionadas ao cálcio e fósforo (Lopes et al., 2024; Tang et al., 2025). Portanto, a eficácia do 25(OH)D₃ depende de condições que favoreçam a conversão nos rins, o que pode ser uma limitação em casos de disfunção renal (Gao et al., 2024; Shi et al., 2024).

O 1-alfa-hidroxicolecalciferol é um metabólito sintético da vitamina D₃ amplamente utilizado como suplemento alimentar em frangos de corte (Shojadoost et al., 2015, 2021). Ele é um intermediário na via de ativação da vitamina D₃, podendo ser administrado diretamente aos animais para substituir ou melhorar a conversão do colecalciferol em 1,25(OH)₂D₃, sua forma ativa (Kheiri & Landy, 2019; Khan et al., 2023). Isso é particularmente útil em situações em que a conversão natural da vitamina D₃ está prejudicada, como em frangos com problemas renais ou hepáticos, que podem ter dificuldades na ativação do colecalciferol (Metwally et al., 2021; H. Wang et al., 2022).

Um dos principais pontos positivos do 1-alfa-hidroxicolecalciferol é a sua conversão imediata em 1,25(OH)₂D₃, sem a necessidade de metabolização adicional no fígado ou rins (Shams et al., 2022; Tang et al., 2025). Isso o torna uma alternativa valiosa em frangos de corte que enfrentam desafios relacionados à conversão de colecalciferol, proporcionando uma resposta rápida e eficaz na regulação de cálcio e fósforo, essenciais para o crescimento ósseo e o desempenho geral dos frangos (Shojadoost et al., 2021). Contudo, o 1-alfa-hidroxicolecalciferol por ser um suplemento sintético, ele tende a ser mais caro do que o colecalciferol e outras formas de vitamina D₃ que dependem da conversão hepática e renal (Ismailova & White, 2022; Souza & Vieites, 2014). Esse custo pode ser um fator limitante, principalmente em sistemas de produção comercial de frangos de corte, onde a viabilidade econômica é crucial (Prietl et al., 2013; Martens et al., 2020). Por esse motivo, o uso do 1-alfa-hidroxicolecalciferol é geralmente restrito a situações específicas de manejo, como em frangos com dificuldades na conversão da vitamina D₃ ou em programas de manejo nutricional que

requerem uma resposta rápida à suplementação de vitamina D₃, sendo menos utilizado em dietas convencionais de grande escala (Kheiri & Landy, 2019; Shams et al., 2022; Khan et al., 2023).

O 1,25-dihidroxicolecalciferol (também conhecido como calcitriol) é a forma biologicamente ativa da vitamina D₃, sendo produzido nos rins pela ação da enzima 1 α -hidroxilase (Wu et al., 2022). Esta forma ativa é fundamental para o metabolismo de cálcio e fósforo, desempenhando funções diretamente relacionadas à regulação desses minerais essenciais (Zhang et al., 2016; Vieites et al., 2017; Chen et al., 2021). O calcitriol exerce ações vitais, principalmente no intestino, onde regula a absorção de cálcio e fósforo, além de atuar na mobilização de cálcio dos ossos, garantindo um equilíbrio adequado desses minerais no organismo (Mathis et al., 2016; Trautenmüller et al., 2021; Castro et al., 2018).

Um dos principais pontos positivos do 1,25(OH)₂D₃ é sua ação direta e imediata (Shojadoost et al., 2021). Como a forma ativa da vitamina D₃, ele não precisa ser convertido em outros metabólitos para exercer suas funções, o que permite uma resposta rápida e eficiente no controle da absorção de cálcio e fósforo (Alves et al., 2018; Hsiao et al., 2018). Essa característica o torna particularmente vantajoso em situações em que há comprometimento na conversão do colecalciferol, como em frangos com problemas renais ou em condições de estresse, em que a conversão do colecalciferol para 25(OH)D₃ e, posteriormente, para 1,25(OH)₂D₃ pode ser prejudicada (Filgueiras et al., 2020; Babazadeh et al., 2022). Além disso, a suplementação com 1,25(OH)₂D₃ é altamente eficiente para promover a melhor absorção de minerais essenciais, como cálcio e fósforo, contribuindo significativamente para a saúde óssea e o metabolismo mineral (Wiątkiewicz et al., 2017; Hodnik et al., 2020).

No entanto, o 1,25(OH)₂D₃ apresenta alguns pontos negativos, especialmente em relação ao custo e à disponibilidade (Souza & Vieites, 2014; Shojadoost et al., 2021). O processo de produção do calcitriol é mais complexo do que o do colecalciferol, o que resulta em um preço mais elevado (Mathis et al., 2016; Castro et al., 2018; Chen et al., 2021). Além disso, sua maior estabilidade como forma ativa contribui para os custos adicionais de fabricação (Shojadoost et al., 2021). Devido a esses fatores, o uso do 1,25(OH)₂D₃ é mais comum em situações específicas, como em frangos que apresentam dificuldades na conversão da vitamina D₃ ou em programas de manejo que exigem controle rigoroso do metabolismo mineral e crescimento rápido (Setiyaningsih et al., 2023).

O 1,25-dihidroxicolecalciferol-glicosídeo, derivado da planta *Solanum glaucophyllum*, oferece uma alternativa interessante ao 1,25(OH)₂D₃ sintético, especialmente devido ao seu custo mais baixo (Alves et al., 2018; Vieites et al., 2018). A principal vantagem dessa forma de

vitamina D₃ é sua origem vegetal, o que a torna uma opção mais acessível para produtores de frangos de corte (Cheng et al., 2004; Vieites et al., 2014, 2017). Além disso, sua alta biodisponibilidade facilita a absorção intestinal, proporcionando uma utilização mais eficiente no metabolismo mineral dos frangos, o que é particularmente benéfico em sistemas de produção intensiva (Vieites et al., 2018; Nunes et al., 2020). No entanto, apesar das vantagens, a produção do 1,25(OH)₂D₃-glicosídeo enfrenta desafios, principalmente pela dependência de fontes vegetais específicas, como o *Solanum glaucophyllum* (Alves et al., 2018; Asnayanti et al., 2024). Isso pode tornar a produção mais limitada em escala, especialmente se houver restrições na disponibilidade dessas plantas (Mathis et al., 2016; Vieites et al., 2018). Outro ponto negativo é que, em situações de deficiência extrema de vitamina D₃, o 1,25(OH)₂D₃ sintético pode ser mais eficaz, já que o 1,25(OH)₂D₃-glicosídeo pode não fornecer a mesma potência em condições de necessidades mais exigentes (Alves et al., 2018).

Concentrações ideais de vitamina D₃

A suplementação de vitamina D₃ em frangos de corte é um aspecto essencial para garantir o adequado metabolismo de cálcio (Ca) e fósforo (P), promovendo o desenvolvimento ósseo, o equilíbrio mineral e a resposta imunológica (Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020). No entanto, as recomendações para a suplementação variam consideravelmente entre diferentes fontes, refletindo as diferenças nas exigências nutricionais ao longo das fases de crescimento e os objetivos produtivos específicos.

Conforme apresentado na Tabela 1, a recomendação de vitamina D₃ para frangos de corte segundo Rostagno et al. (2024) segue um padrão decrescente com a idade, partindo de 3.378 UI/kg de ração na fase inicial (1-8 dias) até 1.915 UI/kg entre 44 e 49 dias. Por outro lado, diretrizes da DSM (2022) indicam um intervalo mais amplo (4.200 a 5.000 UI/kg) ao longo de todo o ciclo produtivo, enquanto Lázaro & Mateos (2008), sugerem uma abordagem faseada, com valores mais altos (3.500 UI/kg) até os 18 dias e uma redução progressiva até o abate. Já o NCR (1994) apresenta uma recomendação conservadora de apenas 200 UI/kg.

Tabela 1. Concentrações recomendadas de suplementação de vitamina D₃ para frangos de corte.

Fase de criação (idade)	Recomendação de vitamina D ₃ (UI por kg de ração)	Referências
1 – 8	3378	Rostagno et al., 2024 - Tabelas brasileiras para aves e suínos.
9 – 17	3126	
18 – 27	2651	
28 – 35	2278	
36 – 43	2054	
44 – 49	1915	DSM, 2022 - Diretrizes de Nutrição com Vitaminas.
1 – abate	4200 – 5000	
1 – 18	3500	Lázaro & Mateos, 2008 -FEDNA.
19 – 34	2800	
35 – abate	2000	
1 – abate	200	(NCR, 1994) - Requisitos Nutricionais para Aves.

Essas variações nas recomendações refletem não apenas diferenças metodológicas e fisiológicas, mas também os avanços no entendimento do metabolismo da vitamina D₃ e suas formas ativas (Alves et al., 2018; Souza & Vieites, 2014). Cada metabólito dessa vitamina possui características distintas em relação à sua atividade biológica, absorção e metabolismo nas aves (Tizziani et al., 2019). A escolha da forma suplementar e a determinação das concentrações ideais devem considerar esses fatores, além de interações com a dieta, as condições ambientais e os desafios sanitários (Nunes et al., 2020; Shojadoost et al., 2021). Estudos indicam que a administração inadequada pode resultar em impactos significativos no desempenho e na saúde das aves (Yu et al., 2022). O excesso de vitamina D₃, especialmente na forma ativa 1,25(OH)₂D₃, pode induzir apoptose mediada por TNF-alfa, contribuindo para toxicidade (Koivisto et al., 2020; Tian et al., 2018), o que reforça a necessidade de evitar superdosagens para minimizar custos desnecessários e problemas metabólicos (Bachmann et al., 2013; Shao et al., 2019).

Portanto, a definição de uma suplementação eficiente e segura requer estudos abrangentes que avaliem os efeitos das diferentes formas de vitamina D₃ ao longo das fases de crescimento dos frangos de corte. O papel regulador dessa vitamina sobre o metabolismo de Ca e P, a formação óssea e processos fisiológicos essenciais deve ser ajustado de forma criteriosa para garantir o crescimento saudável e a eficiência produtiva das aves (Hsiao et al., 2018; Vieites et al., 2018; Asnayanti et al., 2024).

Metabolismo da vitamina D₃ (colecalfiferol) em frangos de corte

O metabolismo da vitamina D₃ (colecalfiferol) em frangos de corte envolve várias etapas importantes, desde a sua absorção até a conversão nos seus metabolitos ativos (Shojadoost et al., 2021). Quando o frango de corte consome uma ração suplementada com colecalfiferol (vitamina D₃), a substância passa pelo processo de digestão e absorção no trato gastrointestinal (Babazadeh et al., 2022). A vitamina D₃, sendo lipossolúvel, é solubilizada em micelas na presença de bile e lipídios na dieta, o que facilita sua absorção no intestino delgado, principalmente na porção jejunal (Jäpelt & Jakobsen, 2013; Hodnik et al., 2020). Dentro das células intestinais, o colecalfiferol é incorporado nos quilomícrons, que são partículas lipoproteicas responsáveis pelo transporte de lipídios (Świątkiewicz et al., 2017, Ismailova & White, 2022). Esses quilomícrons entram na circulação linfática e posteriormente alcançam a corrente sanguínea, permitindo que o colecalfiferol seja distribuído para diferentes tecidos do organismo dos frangos de corte (Shojadoost et al., 2015, 2021).

Uma vez na circulação sanguínea, o colecalfiferol é transportado para o fígado ligado à proteína de ligação à vitamina D₃ (R. U. Khan et al., 2023a; Suarez et al., 2023). No fígado, ocorre a primeira hidroxilação do colecalfiferol, mediada pela enzima 25-hidroxilase, que converte o colecalfiferol em 25-hidroxicolecalfiferol (25(OH)D₃) (Shojadoost et al., 2021). Este metabólito é a principal forma de armazenamento da vitamina D₃ no organismo e a forma predominante encontrada no sangue (Suarez et al., 2023).

O 25(OH)D₃ produzido no fígado é transportado para os rins ligado à proteína de ligação à vitamina D, que protege a molécula de degradação e facilita seu transporte eficiente pelo sangue (Khan et al., 2023; Tang et al., 2025). Nos rins, esse metabólito chega aos túbulos renais proximais, onde ocorre uma segunda hidroxilação na posição 1 da molécula (Lopes et al., 2024; Bassi et al., 2025). Esse processo é catalisado pela enzima 1 α -hidroxilase, uma enzima mitocondrial localizada nas células epiteliais desses túbulos (Shojadoost et al., 2021). A 1 α -hidroxilase adiciona um grupo hidroxila (-OH) na estrutura do 25(OH)D₃, resultando na conversão para a forma biologicamente ativa da vitamina D, o 1,25-dihidroxicolecalfiferol (1,25(OH)₂D₃), também conhecido como calcitriol (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2017). Essa forma ativa é essencial para regular a homeostase do cálcio e do fósforo no organismo, desempenhando papéis vitais no metabolismo mineral e no desenvolvimento ósseo saudável (Hsiao et al., 2018).

Metabolismo de 1,25-Dihidroxicolecalciferol-glicosídeo em frangos de corte

O metabolismo do 1,25-Dihidroxicolecalciferol-glicosídeo ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$), extraído de plantas *Solanum glaucophyllum*, difere do colecalciferol (vitamina D_3) tradicional, que necessita de ativação metabólica no fígado e nos rins para se tornar funcional (Vieites et al., 2017, 2018). Esse metabólito ativo já está na forma biológica funcional ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) e não requer essas etapas de ativação (Asnayanti et al., 2024). O único processo necessário para sua utilização no organismo do frango de corte é a quebra da ligação glicosídica no intestino, que libera o calcitriol (Mathis et al., 2016). Além disso, sua estrutura glicosídica confere características hidrossolúveis, o que altera seu processo de absorção em relação às formas lipossolúveis de vitamina D_3 (Yavaş et al., 2020).

Quando o frango de corte consome o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ presente na dieta, a molécula é absorvida no trato gastrointestinal de maneira diferente do colecalciferol (Nunes et al., 2020, Trautenmüller et al., 2022). Por ser hidrossolúvel devido à ligação glicosídica, sua absorção ocorre de forma mais eficiente e independente da presença de lipídios na dieta, o que normalmente é necessário para as formas lipossolúveis de vitamina D_3 (Shojadoost et al., 2021). Antes de ser completamente absorvido, a molécula precisa passar por uma etapa inicial no intestino, onde a ligação glicosídica é rompida. Essa etapa é catalisada por enzimas específicas, como as glicosidases, presentes nas células intestinais e na microbiota local (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2016). A ruptura dessa ligação libera o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em sua forma ativa, pronto para ser utilizado pelos tecidos do organismo (Alves et al., 2018; Asnayanti et al., 2024).

Após a quebra da ligação glicosídica, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é liberado no lúmen intestinal, atravessa a barreira intestinal e entra na circulação sanguínea (Cheng et al., 2004; Zanutzi et al., 2012; Vieites et al., 2014). Nessa etapa, ele é transportado ligado à proteína de ligação à vitamina D, que protege a molécula e facilita sua distribuição para os órgãos-alvo (Asnayanti et al., 2024). Por já estar em sua forma ativa, ele não precisa passar pelo fígado nem pelos rins para sofrer hidroxilações adicionais, ao contrário do colecalciferol ou do $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Shojadoost et al., 2021).

Uma vez na circulação sistêmica, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ age diretamente nos tecidos-alvo, desempenhando suas funções biológicas de maneira imediata (Nunes et al., 2020). No intestino, ele se liga a receptores de vitamina D presentes nas células intestinais, ativando a transcrição de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio, como a calbindina, aumentando, assim, a absorção de cálcio e fósforo da dieta (Vieites et al., 2016; Nunes et al., 2020). Esse efeito é essencial para o crescimento e a mineralização óssea nos frangos de corte (Asnayanti

et al., 2024). Nos ossos, o calcitriol estimula a atividade dos osteoblastos, promovendo a formação óssea, e regula os osteoclastos, controlando a liberação de cálcio e fósforo para manter a homeostase mineral (Shojadoost et al., 2021; Asnayanti et al., 2024). Nos rins, embora não precise ser ativado, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ atua diretamente nesse órgão, reduzindo a excreção de cálcio e fósforo ao estimular sua reabsorção nos túbulos renais, contribuindo para a manutenção dos níveis séricos desses minerais (Vieites et al., 2017; Alves et al., 2018).

1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Glicosídeo de *Solanum glaucophyllum*: Origem e composição

O metabólito ativo de vitamina D $_3$, 1,25-dihidroxicolecalciferol-glicosídeo, derivado da planta *Solanum glaucophyllum*, tem emergido como uma alternativa promissora ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sintético para a suplementação de vitamina D $_3$ em frangos de corte (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2016, 2018). *Solanum glaucophyllum* é uma planta da família Solanaceae, encontrada predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (Asnayanti et al., 2024). Sua composição química inclui, além do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Glicosídeo, uma variedade de alcaloides e outros compostos bioativos, que podem contribuir para suas propriedades funcionais (Figura 1) (Khan et al., 2022; Becker et al., 2024).

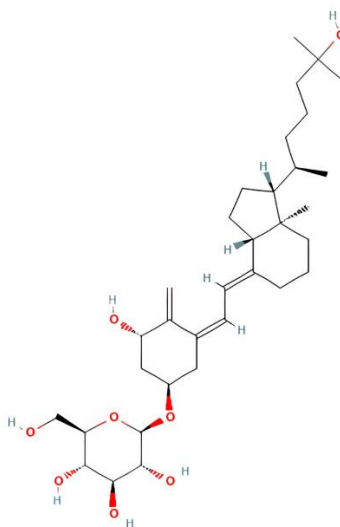


Figura 1. Estrutura química da 1,25-Dihidroxicolecalciferol-glicosídeo. Representação da molécula de calcitriol (forma ativa da vitamina D $_3$) conjugada a uma unidade de glicose, destacando os grupos funcionais envolvidos na sua funcionalidade biológica. Estruturas desenhadas utilizando o software ChemDraw® Professional 15.0.

A diferença entre o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glicosídeo e outras formas de vitamina D $_3$ está justamente na presença do grupo glicídico, o que confere ao composto uma maior solubilidade em água (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2017; Asnayanti et al., 2024). As formas tradicionais de vitamina D $_3$, como o colecalciferol e o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, são lipossolúveis devido à

sua estrutura molecular, que é mais facilmente dissolvida em gorduras e óleos (Shojadoost et al., 2021). Em contraste, o grupo glicídico (um açúcar) presente no 1,25(OH)₂D₃-glicosídeo torna a molécula mais solúvel em água, o que facilita sua absorção no trato intestinal dos frangos (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2014, 2018). Esse fator hidrossolúvel permite que o 1,25(OH)₂D₃-glicosídeo seja mais rapidamente absorvido sem a necessidade de interação com lipídios ou transporte através das células intestinais especializadas em lipídios (Mathis et al., 2016).

A extração do 1,25(OH)₂D₃-glicosídeo a partir da *Solanum glaucophyllum* envolve técnicas de extração vegetal que permitem isolar e purificar o composto ativo (Vieites et al., 2014; Alves et al., 2018). O processo geralmente começa com a colheita das folhas que contêm concentrações significativas do glicosídeo (Shojadoost et al., 2021). Essas partes vegetais são então secas e moídas para facilitar a extração (Cheng et al., 2004; Zanuzzi et al., 2012; Vieites et al., 2014). Em seguida, utiliza-se um solvente orgânico, como o etanol ou metanol, para extrair os compostos lipofílicos da planta (Bachmann et al., 2013). O 1,25(OH)₂D₃-glicosídeo é então isolado e purificado através de técnicas como cromatografia ou filtração, garantindo que a substância ativa seja separada de outros compostos vegetais presentes (Vieites et al., 2014). Após a extração e purificação, o glicosídeo é concentrado e transformado em pó ou em forma líquida para ser incorporado em rações para frangos de corte (Alves et al., 2018).

Investigações científicas mostraram que o 1,25(OH)₂D₃-G desempenha um papel importante na melhoria da absorção intestinal de Ca e P nas aves (Khan et al., 2022; Becker et al., 2024). Essa capacidade é importante para a saúde óssea e o desenvolvimento adequado, influenciando diretamente a produtividade das aves (Jiang et al., 2015; Alves et al., 2018). Além disso, o 1,25(OH)₂D₃-G tem efeitos positivos no sistema imunológico das aves (Nunes et al., 2020). Ele ativa as células imunes e modula a resposta imunológica, melhorando a saúde e a resistência a infecções e doenças ((Jaime et al., 2020; Ismailova & White, 2022). Ao eliminar a necessidade de ativação no fígado e nos rins, esse composto simplifica o processo metabólico, permitindo uma utilização mais eficiente dos nutrientes (Nunes et al., 2020). Essa eficiência pode levar a melhorias na taxa de crescimento, qualidade da carne e eficiência alimentar dos frangos de corte (Hsiao et al., 2018).

Função de 1,25(OH)₂D₃-Glicosídeo no intestino de frangos de corte

Quando 1,25(OH)₂D₃-G se dissocia, a quebra da ligação libera 1,25-dihidroxicolecalciferol ativo e o açúcar residual (glicosídeo) (Alves et al., 2018). Este açúcar residual, após ser separado, é absorvido pelas células intestinais através de transportadores

específicos, como o SGLT1 (Sodium-Glucose Cotransporter 1), que facilita a absorção ativa de glicose e galactose em conjunto com íons de sódio, e o GLUT2 (Glucose Transporter 2), que permite a passagem de glicose e outros monossacarídeos para a corrente sanguínea após sua passagem pelas células intestinais (Becker et al., 2024). Após a absorção, o açúcar é transferido para a corrente sanguínea, onde é metabolizado para fornecer energia ou armazenado como glicogênio para futuras demandas metabólicas (Vieites et al., 2016, 2017). Assim, após a dissociação, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ apenas se separa, liberando o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e o açúcar residual, que são processados separadamente conforme as necessidades energéticas e metabólicas do frango (Shojadoost et al., 2021).

O $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liberado se liga ao receptor VDR (Vitamin D Receptor) nas células epiteliais intestinais (Nunes et al., 2020; Souza et al., 2020). O receptor VDR, quando ativado, inicia uma série de reações que alteram a expressão gênica, promovendo a produção de proteínas envolvidas na absorção de cálcio e fósforo (Asnayanti et al., 2024). Uma das principais proteínas estimuladas é a calbindina D28K, que se liga ao cálcio no citoplasma das células intestinais, formando complexos que ajudam a transportar o cálcio pelo citoplasma até a membrana basolateral da célula (Yang et al., 2018; Nunes et al., 2020). Além da calbindina D28K, $1,25$ -dihidroxicolecalciferol ativa outros transportadores específicos, como o TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid 6) (Souza & Vieites, 2014; Shojadoost et al., 2021; Setiyaningsih et al., 2023). Este transportador facilita a entrada de cálcio diretamente do lúmen intestinal para o interior das células intestinais (Hsiao et al., 2018). O $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também estimula a expressão do NaPi-IIb (Sodium-Dependent Phosphate Transporter IIb), que é responsável pelo transporte ativo de fósforo. Esse cotransportador transporta fósforo em conjunto com íons sódio para dentro das células intestinais (Christakos et al., 2014; Wu et al., 2022).

Após a absorção de cálcio e fósforo no intestino, esses minerais entram diretamente na corrente sanguínea através da membrana basolateral das células intestinais (Hsiao et al., 2018). Uma vez na circulação sanguínea, o cálcio, com o auxílio da calbindina D28K, é transportado para diferentes órgãos e tecidos, como ossos, músculos e outros tecidos, onde desempenha funções essenciais, como manutenção da saúde óssea, contratilidade muscular e regulação de processos metabólicos (Wu et al., 2022). O fósforo, por sua vez, também segue o mesmo caminho, sendo transportado através da corrente sanguínea e distribuído para os locais onde é necessário, como ossos, dentes e tecidos envolvidos na produção de energia e em reações enzimáticas (Wu et al., 2022; Asnayanti et al., 2024). Assim, tanto o cálcio quanto o fósforo

são disponibilizados para o corpo das aves de acordo com suas necessidades fisiológicas (Shojadoost et al., 2021).

Além disso, quando $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se liga ao receptor VDR também exerce um papel significativo em outros processos metabólicos, como o metabolismo de carboidratos (Setiyaningsih et al., 2023). Quando se liga ao receptor VDR, essa vitamina ativa uma série de mecanismos que regulam a expressão de genes associados a esses processos, influenciando diretamente o funcionamento celular (Prietl et al., 2013; Christakos et al., 2014; Babazadeh et al., 2022).

Tabela 2. Resultados de estudos com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G em dietas para frangos de corte.

Nível dietético	Linhagem	Resultados	Referências
0,2; 1,0; 2,0; e 4,0 g por kg de ração.	Ross 308 (1-38 dias)	As folhas de <i>Solanum glaucophyllum</i> podem ser utilizadas com segurança como aditivo na ração até a concentração de 4 g por kg de ração, promovendo o ganho de peso.	Mathis et al., 2016.
0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 μg^1 por kg de ração.	Cobb (1-42 dias)	Reduzem os efeitos negativos de uma redução de 15% nos níveis de cálcio e fósforo disponível da dieta sobre os tecidos ósseos. As concentrações dietéticas ideais são de 1,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para características ósseas e 0,98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ganho de peso.	Vieites et al., 2018.
5 μg por kg de ração durante um desafio com LPS ² .	Cobb (20-25 dias)	A suplementação com 5 μg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glicosídeo por kg de dieta, associada à administração de lipopolissacarídeo, preserva o ganho de peso e modula a resposta inflamatória, enquanto a mineralização óssea permanece inalterada.	Nunes et al., 2020.
0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 μg por kg de ração.	Cobb (1-42 dias)	A suplementação com 5 μg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por kg de ração, combinada com níveis subótimos de cálcio e fósforo disponíveis, resultou em menor consumo de ração, melhor conversão alimentar e resultados satisfatórios no rendimento de carcaça e nos cortes nobres comerciais de frangas aos 42 dias de idade.	Souza et al., 2020.

Uma unidade internacional (UI) de vitamina D_3 é definida como a atividade equivalente a 0,025 microgramas (μg) de vitamina D_3 (NRC, 1994). ²LPS: lipopolissacarídeos.

No estudo de Bachmann et al. (2013), a adição de *Solanum glaucophyllum* em dietas para frangos de corte aos 14 dias de idade foi avaliada. A suplementação com 37,8 μg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G levou a um leve aumento nas concentrações plasmáticas de Ca, mas resultou em redução no ganho de peso corporal e sinais leves de hipervitaminose D. Notavelmente, as concentrações plasmáticas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ permaneceram dentro dos valores normais para frangos de corte (46,6 pmol por mL). Com base nesses achados, os pesquisadores recomendaram inclusões seguras de até 1,0 g de folhas secas de *Solanum glaucophyllum* por quilograma de ração, fornecendo um total de 10 μg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G. Esses achados sugerem que a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G derivado de *Solanum glaucophyllum* pode melhorar

o desempenho dos frangos de corte, desde que as concentrações de inclusão (Tabela 2) sejam adequadas e as dietas atendam às exigências nutricionais de Ca e P (Vieites et al., 2017, 2018).

No geral, a Tabela 2 descreve os efeitos da suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de frangos de corte, destacando seu impacto no desempenho produtivo, na homeostase mineral e na resposta inflamatória. Os estudos apresentados indicam que a inclusão de folhas de *Solanum glaucophyllum* pode ser feita com segurança em até 4 g/kg de ração, promovendo melhorias no ganho de peso (Mathis et al., 2016; Vieites et al., 2018; Souza et al., 2020). Além disso, a suplementação direta com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ mostrou-se eficaz na atenuação dos efeitos negativos da redução de cálcio e fósforo disponíveis na dieta, favorecendo o desenvolvimento ósseo e o crescimento das aves (Vieites et al., 2018; Souza et al., 2020). A concentração de 1,15 µg/kg foi identificada como ideal para a saúde óssea, enquanto 0,98 µg/kg foi mais adequada para otimizar o ganho de peso (Mathis et al., 2016).

Quando administrado em dietas com níveis subótimos de Ca e P, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, na dosagem de 5 µg/kg, resultou em menor consumo alimentar, mas melhorou a conversão alimentar e garantiu bons índices de rendimento de carcaça e cortes ((Mathis et al., 2016; Vieites et al., 2018; Souza et al., 2020). Além disso, em condições de desafio inflamatório induzido por lipopolissacarídeos (LPS), a suplementação com 5 µg/kg preservou o ganho de peso e modulou a resposta inflamatória, sem comprometer a mineralização óssea (Nunes et al., 2020). Dessa forma, os estudos evidenciam que o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ pode ser um aditivo estratégico na nutrição de frangos de corte, contribuindo para a eficiência produtiva e o equilíbrio metabólico, especialmente em dietas com menor disponibilidade de minerais essenciais (Vieites et al., 2018).

No contexto molecular, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode modular a expressão de genes como CYP24A1 e CYP27B1, responsáveis pela ativação e degradação da vitamina D (Meyer & Pike, 2020). Além disso, proteínas transportadoras como NCX1 e PMCA1b desempenham papéis fundamentais na homeostase do cálcio, regulando a concentração desse mineral dentro das células sob a influência de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Shojadoost et al., 2015, 2021; Hanel et al., 2022).

A absorção de fósforo, por sua vez, é facilitada pelo transportador NaPi-IIb, que utiliza um gradiente de sódio para captar o mineral da dieta e transportá-lo para as células intestinais (Yang et al., 2020; Khan et al., 2023). Da mesma forma, os transportadores PiT-1 e PiT-2 regulam a concentração intracelular de fósforo, desempenhando papéis essenciais na síntese de DNA, formação óssea e outros processos metabólicos (Hsiao et al., 2018; Shao et al., 2019).

No caso do cálcio, a proteína TRPV6, pertencente à família dos canais iônicos TRP, atua no transporte seletivo desse mineral pela membrana das células intestinais, sendo sua

expressão e atividade moduladas diretamente por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Shojadoost et al., 2015; Hsiao et al., 2018; Wu et al., 2022). O aumento da expressão de TRPV6 em resposta à vitamina D aprimora a absorção de cálcio, assegurando concentrações adequadas para funções fisiológicas vitais, como mineralização óssea, contração muscular, transmissão nervosa e coagulação sanguínea (Li et al., 2021; Babazadeh et al., 2022). Dessa forma, a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não apenas influencia a absorção mineral e a saúde óssea, mas também regula vias metabólicas críticas para a homeostase do cálcio e do fósforo, garantindo o equilíbrio fisiológico necessário ao desenvolvimento e desempenho das aves (Wu et al., 2022). Estudos detalhados sobre a expressão de genes transportadores estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Genes transportadores no intestino de frangos de corte suplementados com vitamina D_3 .

Níveis dietéticos	Linhagem	Resultados	Referências
Microvit D_3 (80; 200; 500; 1250; 3125 e 7813 IU por kg de ração)	Ross 308 (1-31 dias)	A suplementação de 500 UI/kg de ração aumentou o desempenho zootécnico, o teor de cinzas da tíbia e a expressão intestinal do transportador NaPi-IIb em ambas as fases de crescimento.	Aye Cho et al., 2020.
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50 IU por kg de ração)	Ross 308 (1-19 dias)	Regulou as concentrações de expressão do gene transportador de cálcio e estimulou a absorção de cálcio no intestino proximal (duodeno e jejuno), melhorando o desempenho das aves e a mineralização óssea.	Wu et al., 2022.
Basal diet + 100 CFU por kg (<i>C. butyricum</i>) + 25 μg por kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	Cobb 500 (1-21 dias)	Melhora o desempenho zootécnico, as respostas imunes, o desenvolvimento ósseo e a microflora intestinal em frangos de corte em fase inicial.	Yu et al., 2022.
Vitamin D_3 : (0; 125; 250; 500; 1000 e 2000 IU por kg de ração)	Ross 308 (1-21 dias)	A suplementação de 1.000 a 2.000 UI por kg de vitamina D_3 resultou em um aumento significativo na expressão de mRNA dos transportadores de cálcio e fósforo, incluindo PMCA1b, NCX1, NaPi-IIb, PiT-1 e PiT-2.	Han et al., 2022.
$25(\text{OH})\text{D}_3$: (3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 μg por kg de ração)	Cobb 500 (1-21 dias)	Melhorou a taxa de crescimento e promoveu a transcrição do gene transportador de cálcio intestinal em frangos de corte com idade entre 1 e 21 dias. A suplementação ideal de $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foi de pelo menos 12,5 μg por kg, considerando as concentrações de expressão dos genes responsáveis pelo transporte de cálcio no intestino.	Liu et al., 2023.

$25(\text{OH})\text{D}_3$: 25-hidroxicolecalciferol. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: 1,25-dihidroxicolecalciferol. PMCA1b: ATPfase de Cálcio da Membrana Plasmática 1b. NCX1: Troca de Sódio-Cálcio 1. NaPi-IIb: Co-transportador de Sódio-Fosfato IIb. PiT-1 e PiT-2: Transportadores de Fosfato 1 e 2. TRPV6: Receptor Transiente Potencial Vaniloide 6. nVDR: Receptor Nuclear de Vitamina D. mVDR: Receptor de Vitamina D associado à Membrana.

Em geral, a tabela descreva que a suplementação entre 500 e 2.000 UI/kg de vitamina D₃ ou doses específicas de metabólitos ativos como 1,25(OH)₂D₃ e 25(OH)D₃ resulta em aumento da expressão de genes-chave, incluindo PMCA1b, NCX1, NaPi-IIb, PiT-1 e PiT-2, responsáveis pelo transporte e homeostase de cálcio e fósforo no intestino. Esses achados reforçam a importância da suplementação adequada de vitamina D₃ e seus metabólitos na dieta dos frangos de corte, otimizando a eficiência da absorção mineral e promovendo um crescimento saudável (Aye Cho et al., 2020; Liu et al., 2023). A variação nas respostas observadas entre os estudos destaca a necessidade de ajustes precisos nas concentrações suplementadas para maximizar os benefícios, levando em consideração fatores como idade, linhagem e interação com outros nutrientes (Wu et al., 2022; Yu et al., 2022).

Contribuições do 1,25(OH)₂D₃ para a mineralização óssea

Quando o 1,25(OH)₂D₃ promove o envio de cálcio (Ca) e fósforo (P) ao osso, seu papel na mineralização óssea envolve uma complexa série de interações entre células como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Cao et al., 2021). Esses processos colaboram para garantir a formação e manutenção adequada da matriz óssea (Hui et al., 2022). Os osteoblastos são células especializadas na formação da matriz óssea e na deposição de minerais (Hui et al., 2022). Quando o 1,25(OH)₂D₃ se liga ao seu receptor (VDR) nas células osteoblásticas, ele ativa a expressão de genes relacionados à produção de proteínas estruturais, como o colágeno, e glicoproteínas, que auxiliam na mineralização óssea (Trautenmüller et al., 2021). Essas proteínas ajudam a organizar a matriz óssea, criando um ambiente adequado para a deposição de cálcio e fósforo (Wu et al., 2022). Enquanto os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea, promovendo a reabsorção óssea e removendo o tecido ósseo antigo e desgastado (Asnayanti et al., 2024). O 1,25(OH)₂D₃ também influencia os osteoclastos, estimulando a produção de RANKL (receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante), uma proteína que aumenta a formação e atividade osteoclásticas (John et al., 2014). Isso permite uma reabsorção controlada, fundamental para o equilíbrio entre formação e remoção óssea, evitando o acúmulo excessivo de tecido ósseo (Shojadoost et al., 2021).

Por outro lado, os osteócitos são células maduras que desempenham um papel crucial na regulação e monitoramento do metabolismo ósseo (Castro et al., 2018; Cao et al., 2021). Eles estão interconectados por canais chamados canalículos, permitindo a comunicação com outros osteócitos, osteoblastos e osteoclastos (Shojadoost et al., 2021). A interação contínua entre essas células é essencial para a manutenção da saúde óssea e o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Asnayanti et al., 2024).

Neste contexto, com a captação de cálcio e fósforo, esses minerais são direcionados ao tecido ósseo pelo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ após a absorção intestinal (Hsiao et al., 2018). Os osteoblastos produzem uma matriz rica em colágeno, sobre a qual esses minerais são depositados, promovendo a mineralização óssea (Vieites et al., 2016). A mineralização ocorre de forma integrada com a atividade conjunta de osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea, e osteoclastos, que auxiliam na reabsorção e remodelação óssea (Cao et al., 2021; Hui et al., 2022). Os osteócitos monitoram continuamente o estado do tecido ósseo e comunicam-se com osteoblastos e osteoclastos para regular esses processos, garantindo a deposição adequada de minerais e o equilíbrio necessário para a saúde óssea (Babazadeh et al., 2022).

A ação coordenada de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos permite que o tecido ósseo seja continuamente renovado, adaptando-se às demandas do organismo (Shojadoost et al., 2015). Além disso, a produção de fatores hormonais e citocinas, influenciada pelo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, contribui significativamente para esse processo (Babazadeh et al., 2022). Fatores como o fator de crescimento ósseo (FCO), fator de crescimento transformador beta (FCT- β) e outros envolvidos na sinalização celular auxiliam no equilíbrio dinâmico entre os tecidos ósseo e mineral (R. U. Khan et al., 2023a). No contexto da mineralização óssea, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não só regula diretamente osteoblastos e osteoclastos, mas também modula a expressão de fatores associados à diferenciação celular (Babazadeh et al., 2022). Isso inclui a regulação de proteínas como osteocalcina, que liga o cálcio e facilita sua integração na matriz óssea, além de outras proteínas que promovem a síntese de fosfatases alcalinas e inibidores que controlam a mineralização óssea (Asnayanti et al., 2024).

Neste contexto, no período inicial de 1 a 21 dias, os frangos de corte passam por uma rápida expansão óssea, necessitando de níveis adequados de vitamina D_3 para promover a mineralização óssea eficiente (Shojadoost et al., 2021). Durante essa fase, os osteoblastos desempenham um papel crucial na formação da matriz óssea, promovendo a deposição de cálcio (Ca) e fósforo (P) na matriz óssea (Alves et al., 2018). A vitamina D_3 ativa os osteoblastos, estimulando a expressão de genes relacionados à síntese de proteínas estruturais, como o colágeno, fundamentais para a construção de uma estrutura óssea fortificada (Nguyen-Yamamoto et al., 2017; Nunes et al., 2020). Além disso, nesse estágio, o equilíbrio entre formação óssea e reabsorção, mediado pelos osteoclastos, é essencial para evitar distúrbios ósseos (Baldock et al., 2006; Masuyama et al., 2006; Vieites et al., 2016).

Já no período de 22 a 42 dias, com o crescimento ósseo estabilizado, a vitamina D_3 continua a ser essencial para a manutenção da saúde óssea, mas com um foco em níveis mais moderados (Cao et al., 2021; Hui et al., 2022). A influência da vitamina D_3 sobre os osteoblastos

e osteoclastos ainda é crítica, mas o foco se desloca para a regulação da atividade osteoclástica, evitando a reabsorção excessiva de tecido ósseo (Vieites et al., 2014; Souza et al., 2020). Nessa fase, os osteócitos desempenham um papel importante no monitoramento contínuo da saúde óssea, regulando a interação entre osteoblastos e osteoclastos para manter o equilíbrio mineral ósseo (Babazadeh et al., 2022). Assim, a suplementação adequada de vitamina D₃ ajuda a manter a integridade óssea e a prevenir condições como deficiência mineral óssea (Asnayanti et al., 2024).

Impacto do ganho de peso no sistema locomotor de frangos de corte

À medida que os frangos de corte crescem e ganham peso rapidamente devido à alta eficiência genética e nutricional das linhagens comerciais, as forças biomecânicas exercidas pelas pernas aumentam consideravelmente (Tahamtani et al., 2021). Durante o crescimento, o peso corporal gera uma carga crescente sobre os membros inferiores, exigindo que o sistema musculoesquelético suporte forças compressivas, tensivas e cisalhantes que são proporcionalmente maiores em aves mais pesadas (Khan et al., 2021). Esse aumento na força gerada pelas pernas está diretamente relacionado ao peso corporal e ao centro de gravidade da ave (Khan et al., 2023). Com o ganho de peso, as articulações, especialmente da tíbia, precisam resistir a pressões intensificadas durante atividades como caminhar, levantar-se e abaixar (Mabelebele, 2017). O contínuo aumento dessas cargas, aliado ao rápido crescimento ósseo e à taxa limitada de maturação do tecido esquelético, pode causar desequilíbrios estruturais e biomecânicos (Asnayanti et al., 2024).

Entre as consequências mais comuns estão as deformidades ósseas (Figura 2), como a discondroplasia tibial e as curvaturas em *valgus* ou *varus* (Khan et al., 2023; Li et al., 2023). As pernas arqueadas são caracterizadas por uma curvatura para fora (*valgus*) ou para dentro (*varus*) das pernas em relação ao eixo corporal (Figura 2), impactando significativamente a mobilidade e levando a problemas de saúde potenciais (Babazadeh et al., 2022). A discondroplasia tibial afeta as articulações das pernas, causando inflamação e inchaço, e desorganiza o crescimento da tíbia (Semenenko et al., 2021). Esta condição é marcada por um defeito na ossificação endocondral, identificado por cartilagem opaca, não vascularizada e desmineralizada em metáfises, frequentemente acompanhada de necrose (Shojadoost et al., 2021; Kulyar et al., 2022).



Figura 2. Frango com pernas normais e com três deformidades. (A) normal, (B) Curvatura para fora, (C) Curvatura para dentro, (D) Rotação (Adaptado de Siegel et al., 2019).

Neste contexto, o impacto das forças excessivas sobre os ossos pode levar à formação de regiões cartilaginosas não mineralizadas, reduzindo a resistência óssea e predispondo a fraturas ou inflamações articulares (Çapar Akyüz & Onbaşlar, 2020; Li et al., 2023). Além disso, a incapacidade do tecido ósseo de se remodelar na mesma velocidade que o crescimento corporal contribui para a redução da mobilidade e, em casos graves, para o desenvolvimento de dores crônicas e claudicação (Semenenko et al., 2021; Hui et al., 2022). Essas alterações biomecânicas também afetam a postura das aves (Khan et al., 2023). Com o aumento do peso corporal, o deslocamento do centro de gravidade obriga as aves a redistribuírem o peso sobre os membros inferiores, causando maior pressão sobre as articulações distais da tíbia e metatarso (Siegel et al., 2019). Esse processo pode ser exacerbado por deficiências nutricionais, como baixos níveis de cálcio e fósforo, ou pela falta de vitamina D₃, essencial para o metabolismo ósseo (Li et al., 2023).

Estudos como os de Hui et al. (2022), Mirakzahi et al. (2017) e Vieites et al. (2017) destacam a associação entre suplementação com vitamina D₃ e a redução de anormalidades ósseas. Ribeiro et al. (2021) observaram que a inclusão de 1,25(OH)₂D₃ em dietas de frangos de corte estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea através do processo de osteoclastogênese. Rao et al. (2006) relataram um aumento no conteúdo de cinzas ósseas e uma redução na ocorrência de raquitismo com suplementação de vitamina D₃. Além disso, Biehl e Baker (1997) encontraram que o uso de 1,25(OH)₂D₃ e 1 α -hidroxi-colecalciferol em dietas com baixo teor de P disponível melhorou a absorção de fósforo fítico e reduziu a discondroplasia tibial em aves.

Khan & Mukhtar (2013), observaram que a suplementação com vitamina D₃ em concentrações mais elevadas (2500 - 3500 IU por kg) reduziu a incidência de discondroplasia tibial, sugerindo o papel da vitamina D₃ na maturação de condrócitos. Nääs et al. (2012) estudaram os efeitos da suplementação dietética com vitamina D₃, dividindo as aves em dois grupos: um recebendo solução placebo e outro grupo recebendo 25(OH)D₃ solúvel. As aves

suplementadas com 25(OH)D₃ apresentaram menos problemas nas pernas, indicando que a vitamina D₃ dietética reduziu a severidade da claudicação e da discondroplasia tibial.

Portanto, a suplementação com 1,25(OH)₂D₃ e outros derivados da vitamina D₃ contribui significativamente para a saúde óssea de frango de corte, como é apoiado por diversos estudos (Bachmann et al., 2013; Shojadoost et al., 2015; Ribeiro et al., 2021; Asnayanti et al., 2024). A significativa diminuição de anormalidades ósseas, juntamente com melhorias no ganho de peso e qualidade óssea, ressalta o papel vital da vitamina D₃ no desenvolvimento do sistema esquelético de frangos de corte (Souza & Vieites, 2014, 2017; Alves et al., 2018; Cao et al., 2021; Wu et al., 2022).

Papel de 1,25(OH)₂D₃ na modulação da resposta imune

A ativação do sistema imunológico é essencial para a proteção de frangos de corte contra patógenos e contribui diretamente para a manutenção da saúde, o desempenho zootécnico e a eficiência produtiva (Kumar et al., 2017; Jaime et al., 2020). O sistema imunológico dessas aves é composto por duas linhas principais de defesa: a imunidade inata e a adaptativa, que trabalham de maneira integrada (Babazadeh et al., 2022; Setiyaningsih et al., 2023). A imunidade inata é a primeira linha de defesa, caracterizada por respostas rápidas e inespecíficas que atuam imediatamente após o reconhecimento de patógenos (Shojadoost et al., 2021; Wei et al., 2024). Nesse processo, macrófagos e heterófilos desempenham funções essenciais, realizando fagocitose e eliminando agentes invasores (Nunes et al., 2020). Além disso, a imunidade inata promove a liberação de citocinas, moléculas sinalizadoras que coordenam as respostas imunes e a comunicação entre as células do sistema imunológico, preparando o organismo para respostas subsequentes mais específicas (Kumar et al., 2023).

Por sua vez, a imunidade adaptativa é ativada caso a imunidade inata não seja suficiente para conter o patógeno (Nunes et al., 2020; Shojadoost et al., 2021). Essa linha de defesa envolve linfócitos T e B, que reconhecem antígenos de forma específica e desencadeiam respostas direcionadas (Kumar et al., 2017, 2023). A imunidade adaptativa também é responsável pela formação de memória imunológica, o que garante respostas mais rápidas e eficazes em exposições subsequentes ao mesmo patógeno (Chou et al., 2021). Em frangos de corte, esse sistema integrado é crucial para lidar com os desafios impostos pela criação intensiva, como alta densidade populacional, estresse ambiental e exposição a patógenos (Nunes et al., 2020).

Um aspecto relevante na modulação do sistema imunológico de frangos de corte é o papel da vitamina D₃ ativa, 1,25(OH)₂D₃ (Geng et al., 2018; Nunes et al., 2020; Ismailova &

White, 2022). Essa forma ativa da vitamina D₃ atua como um modulador imunológico, ligando-se ao receptor de vitamina D₃ (VDR) em células como macrófagos, linfócitos T e células dendríticas (Shojadoost et al., 2015, 2021). Essa interação regula a expressão de genes relacionados à produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10, promovendo o equilíbrio entre respostas pró e anti-inflamatórias (Nunes et al., 2020). Esse equilíbrio é essencial para prevenir inflamações crônicas ou excessivas, que podem comprometer a saúde e o desempenho produtivo das aves (Prietl et al., 2013; Rodriguez-Lecompte et al., 2016).

As interleucinas, mediadoras críticas no sistema imunológico, desempenham papéis diversos na regulação da inflamação e das respostas imunes em frangos de corte (Saini et al., 2013; Chen et al., 2021). A interleucina 1 β , por exemplo, é um importante mediador da inflamação aguda, sendo liberada em resposta à presença de patógenos (Nunes et al., 2020). Enquanto a interleucina 6, por sua vez, regula funções imunológicas (Martens et al., 2020). Neste contexto, as respostas inflamatórias, embora essenciais para a defesa contra lesões, infecções e outros desafios, precisam ser cuidadosamente reguladas para evitar danos aos tecidos saudáveis (Nunes et al., 2020). A regulação inadequada da inflamação pode levar a prejuízos no crescimento, na conversão alimentar e na saúde geral dos frangos de corte (Shojadoost et al., 2021).

Estudos com vitamina D₃ indicam que a regulação das interleucinas é fundamental para maximizar a eficiência metabólica e a resistência a doenças em frangos de corte (Schwarz et al., 2012; Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Nunes et al., 2020; Kumar et al., 2023). Outros estudos podem ser observados na tabela 4, onde demonstram que a suplementação com diferentes formas de vitamina D₃ impacta positivamente o sistema imunológico de frangos de corte, influenciando tanto a resposta humoral quanto a resposta celular. A inclusão de 25(OH)₂D₃ e 1,25(OH)₂D₃ nas dietas resultam no aumento da expressão gênica de interleucina 10 (IL-10) e imunoglobulina G (IgG), sugerindo uma modulação imunológica benéfica, conforme descrito por Chou et al. (2009) e Morris et al. (2015).

Outro ponto relevante é o efeito da vitamina D₃ na resposta vacinal e na imunidade intestinal. O estudo de Vazquez et al. (2018) mostrou que a combinação de 5.000 IU/kg de vitamina D₃ com 69 μ g/kg de 1,25(OH)₂D₃ promoveu um aumento significativo nos anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle (NDV), imunoglobulina A intestinal e células T circulantes, sugerindo um reforço da imunidade adquirida. Além disso, a associação entre 1,25(OH)₂D₃ e probióticos foi eficaz na melhora do desempenho dos frangos de corte, conforme relatado por Yu et al. (2022). Esses achados indicam que a vitamina D₃, em sinergia com outros aditivos, pode contribuir para um equilíbrio imunológico mais eficiente e para o

desenvolvimento ósseo e intestinal adequado em frangos de corte (Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020).

Tabela 4. Efeito da vitamina D₃ no sistema imunológico de frangos de corte.

Níveis dietéticos	Linhagem	Resultados	Referências
3,000 IU por kg de 25(OH) ₂ D ₃ .	Cobb 500 (1-21 dias)	Aumento da expressão dos genes da imunoglobulina G (IgG) e da interleucina 10.	Chou et al., 2009.
100 µg por kg de 25(OH) ₂ D ₃ .	Leghorn Branco (1-21 dias)	Redução das perdas na produção após o desafio e aumento da expressão do gene da interleucina 10.	Morris et al., 2015.
5 µg de 1,25(OH) ₂ D ₃ por kg.	Cobb 500 (1-21 dias)	Aumento na expressão de calbindina, β-glucuronidase, TRPV6 e do co-transportador NaPi IIb em níveis de mRNA.	Hsiao et al., 2018.
5,000 IU combinado com 69 µg por kg de 1,25(OH) ₂ D ₃ .	Ross 308 (1-21 dias)	Elevação das concentrações de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle (NDV), imunoglobulina A intestinal e células T no sangue.	Vazquez et al., 2018.
Dieta basal + 100 CFU por kg (<i>C. butyricum</i>) + 25 µg por kg de 1,25(OH) ₂ D ₃ .	Cobb 500 (1-21 dias)	Melhora no desempenho, nas respostas imunes, na capacidade antioxidante, no desenvolvimento ósseo e na saúde da microflora intestinal durante a fase inicial de crescimento.	Yu et al., 2022.

25(OH)₂D₃: 25-hydroxycholecalciferol. 1,25(OH)₂D₃: 1,25-dihydroxycholecalciferol.

Peptídeos relacionados ao hormônio paratireoide (PTH) e 1,25(OH)₂D₃

Durante o crescimento ósseo em aves, a proteína relacionada ao hormônio paratireoide (PTHrP) regula o equilíbrio de cálcio (Ca) (Shojadoost et al., 2021). Essa proteína é central no processo, facilitando a liberação de Ca dos ossos, um passo necessário quando o organismo precisa de Ca adicional para funções metabólicas, como contração muscular, transmissão nervosa e atividades celulares fundamentais (Proszkowiec-Weglarz & Angel, 2013; Asnayanti et al., 2024). Ao manter a homeostase do Ca, a PTHrP garante que um nível adequado de Ca esteja disponível para sustentar funções fisiológicas, contribuindo significativamente para a integridade óssea e o desenvolvimento saudável das aves (Sousa et al., 2015; Cao et al., 2021).

Por outro lado, o hormônio paratireoide (PTH) desempenha um papel complexo nos ossos, rins e intestino, influenciando as concentrações de Ca no plasma para atender às demandas do organismo (Jacquillet & Unwin, 2019). Quando as concentrações de Ca no sangue diminuem, as glândulas paratireoides liberam PTH, iniciando uma série de ações fisiológicas essenciais

(Hsiao et al., 2018; Jacquillet e Unwin, 2019). Além disso, o PTH contribui significativamente para a ativação da vitamina D₃, especialmente sua forma ativa (Hsiao et al., 2018).

Qualquer desequilíbrio nesse sistema pode resultar em problemas de saúde óssea, reprodutiva ou metabólica nas aves (Hsiao et al., 2018; Jacquillet e Unwin, 2019). Portanto, a interação entre o PTH e o 1,25(OH)₂D₃ em frangos de corte é necessária para regular as concentrações de Ca e P em seus corpos, seja ativando genes relacionados à absorção intestinal ou regulando sua excreção pelos rins (Aye Cho et al., 2020; Lv et al., 2022). Estudos sobre a suplementação de vitamina D₃ em frangos de corte indicam um impacto significativo na expressão de vários genes relacionados ao metabolismo ósseo e resposta imunológica ((Tay-Zar et al., 2019; Nunes et al., 2020; Souza et al., 2020; Liu et al., 2023). No estudo de Liu et al. (2023) observaram um aumento notável na expressão de PTHrP em frangos suplementados com vitamina D₃, destacando a importância da vitamina na regulação do metabolismo ósseo e da qualidade da carne.

No estudo realizado por Cao et al. (2021), frangos de corte criados de 1 a 21 e de 22 a 42 dias de idade foram alimentados com concentrações crescentes de fósforo não fitato, variando de 0,15% a 0,55%, e de 0,15% a 0,43%, respectivamente. Os resultados revelaram uma associação próxima entre a retenção de fósforo nos ossos e o desenvolvimento ósseo, influenciado por várias variáveis. Particularmente, o estudo destacou uma correlação significativa entre esses processos e a atividade de hormônios e reguladores específicos. Foi observada uma associação consistente entre a retenção de P nos ossos e marcadores como as concentrações séricas de PTH e 1,25(OH)₂D₃, que são hormônios fundamentais na regulação do metabolismo de Ca e P no corpo.

Em situações de hipercalcemia, caracterizadas por um excesso de Ca no sangue, a resposta fisiológica envolve não apenas a inibição da secreção de PTH, mas também um aumento na produção de calcitonina (Shojadoost et al., 2015; Kumar et al., 2017; Alves et al., 2018). Estudos em frangos de corte revelaram que a deficiência de PTH está associada a alterações na densidade mineral óssea, (Chen et al., 2021; Zhou et al., 2023).

Neste contexto, frangos com deficiência de PTH exibem maior conteúdo mineral em comparação com o osso cortical (Kumar et al., 2017, 2023). Esse desequilíbrio na mineralização óssea pode levar ao aumento da fragilidade óssea, tornando os ossos mais suscetíveis a fraturas (Colet et al., 2015; Castro et al., 2018). Pesquisas indicam que a calcitonina pode ter um efeito anabólico sobre o osso trabecular, promovendo sua mineralização (Rao et al., 2006; Zhou et al., 2023). No entanto, esse efeito parece ser menos eficaz ou ausente no osso cortical em frangos de corte com deficiência de PTH induzida experimentalmente (Hsiao et al., 2018). Essa

observação pode ser especialmente relevante em áreas específicas do osso, como a diáfise e a epífise posterior, onde a redução na densidade óssea pode ser atribuída à menor mineralização do osso cortical (Rao et al., 2006; Warren et al., 2020; Wu et al., 2022; Lyu et al., 2023; Zhou et al., 2023).

Portanto, os estudos destacam a importância da regulação hormonal, particularmente envolvendo o PTH e a calcitonina, na manutenção da saúde óssea em frangos de corte (Shojadoost et al., 2015, 2021; Hsiao et al., 2018; Alves et al., 2018). Compreender esses mecanismos hormonais e seus efeitos na mineralização óssea é crucial para desenvolver estratégias que garantam a saúde óssea e a resistência dos ossos em frangos de corte (Shojadoost et al., 2015; Sakkas et al., 2019; Lopes et al., 2023).

Calcitonina e 1,25(OH)₂D₃

A calcitonina, produzida pelas células C parafoliculares da glândula tireoide, atua de forma oposta ao PTH (Lim & Ryu, 2022). Enquanto o PTH aumenta as concentrações de cálcio (Ca) no sangue, a calcitonina reduz a reabsorção óssea, inibindo a liberação de Ca e fósforo (P) dos ossos para a corrente sanguínea (Pande et al., 2015). Essa interação entre calcitonina e PTH é necessária para manter a homeostase de Ca no corpo (Proszkowiec-Weglarz & Angel, 2013; Veldurthy et al., 2016; Hsiao et al., 2018).

A síntese de calcitonina ocorre como um pró-hormônio no retículo endoplasmático, sendo posteriormente secretada para a corrente sanguínea por exocitose, um processo regulado pelas concentrações intracelulares de Ca e AMP cíclico (Babazadeh et al., 2022). Após a liberação, a calcitonina sofre metabolismo primário nos rins, com uma porção menor sendo metabolizada no fígado (Shojadoost et al., 2021). Além disso, exerce efeitos secundários nos túbulos renais e no intestino, contrariando as ações do hormônio PTH (Christakos et al., 2014).

A influência da calcitonina é evidente na sua redução da remoção de Ca por células osteoblásticas e osteocíticas da membrana óssea, impactando tanto os efeitos de curto quanto de longo prazo ao diminuir a reabsorção óssea através da inibição dos osteoclastos (Baldock et al., 2006). Essa redução leva a um efeito hipofosfatêmico, promovendo o aumento do movimento de fósforo do fluido extracelular para os ossos, contribuindo para o equilíbrio mineral ósseo e a resistência estrutural necessária para o crescimento das aves (Perine et al., 2022).

Em aves, a suplementação com vitamina D₃ pode influenciar a expressão gênica relacionada à calcitonina (Pande et al., 2015). A vitamina D desempenha um papel significativo na regulação do metabolismo de Ca e P, afetando a homeostase mineral (Hsiao et al., 2018). A

vitamina D₃ ativa (1,25(OH)₂D₃) facilita a absorção intestinal de Ca e P (Aye Cho et al., 2020; Han et al., 2022; Liu et al., 2023). Quando as concentrações de Ca estão baixas, a vitamina D ativa auxilia no aumento da absorção intestinal desses minerais, influenciando indiretamente as concentrações de Ca no sangue e a necessidade de regulação pela calcitonina (Sousa et al., 2015). No entanto, a relação direta entre a suplementação de vitamina D₃ em aves e a expressão gênica específica relacionada à calcitonina pode variar devido a fatores como a dosagem, o estado fisiológico e a interação com outros hormônios e componentes do metabolismo mineral (Souza e Vieites, 2014; Vieites et al., 2017, 2018).

Em um estudo conduzido por Perine et al. (2022), investigando a demanda de Ca e a suplementação de vitamina D em codornas durante as primeiras fases de crescimento, a relação Ca:P mais eficaz para o ganho de peso foi 1,78:1. Isso foi observado quando a dieta continha 0,73% de Ca e 0,41% de P disponível. Os pesquisadores mantiveram uma concentração constante de P entre os diferentes tratamentos, resultando em variações na relação cálcio-fósforo, variando de 1:1 a 2,20:1. Os autores atribuíram esses resultados à relação entre Ca e P presente na dieta, influenciada pelas ações de hormônios como a calcitonina e o PTH. Esses hormônios, juntamente com a vitamina D, desempenham papéis necessários no metabolismo ósseo. Portanto, dietas com concentrações mais baixas de P também exigem menos cálcio para manter uma proporção ideal entre esses minerais.

Portanto, a interação entre calcitonina, PTH e vitamina D₃ é essencial para a homeostase mineral e o equilíbrio ósseo das aves (Shojadoost et al., 2021). Enquanto a calcitonina inibe a reabsorção óssea, o PTH estimula a liberação de cálcio, e a vitamina D₃ potencializa a absorção intestinal de minerais (Asnayanti et al., 2024). A suplementação com vitamina D₃ pode influenciar essa dinâmica, mas seus efeitos variam conforme a proporção dietética de Ca:P e a regulação hormonal (Colet et al., 2015; Babazadeh et al., 2022). Assim, compreender esses mecanismos é fundamental para otimizar a nutrição e o desenvolvimento esquelético das aves (Castro et al., 2018; Vieites et al., 2018).

REFERÊNCIAS

- Alharbi, K., Asnayanti, A., Hasan, A., Vaught, W.J., Buehler, K., Van der Klis, J.D., Gonzalez, J., Kidd, M.T., Alrubaye, A., 2025. Investigating the effect of 1,25 dihydroxycholecalciferol-glycosides and phytogetic antioxidants against bacterial chondronecrosis induced by aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research* 34, 100507. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100507>
- Alves, O. dos S., Calixto, L.F.L., Araujo, A.H.B., Torres-Cordido, K.A.A., Reis, T.L., Calderano, A.A., 2018. Decreased levels of vitamin D₃ and supplementation with 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. *Ciência Rural* 48. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170705>
- Asnayanti, A., Alharbi, K., Do, A.D.T., Al-Mitib, L., Bühler, K., Van der Klis, J.D., Gonzalez, J., Kidd, M.T., Alrubaye, A.A.K., 2024. Early 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosides supplementation: an efficient feeding strategy against bacterial chondronecrosis with osteomyelitis lameness in broilers assessed by using an

- aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research* 33, 100440. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100440>
- Aye Cho, T.-Z., Sadiq, M.B., Srichana, P., Anal, A.K., 2020. Vitamin D3 enhanced intestinal phosphate cotransporter genes in young and growing broilers. *Poult Sci* 99, 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.038>
- Babazadeh, D., Razavi, S.A., Abd El-Ghany, W.A., F Cotter, P., 2022. Vitamin D Deficiency in Farm Animals: A Review. *Farm Animal Health and Nutrition* 1, 10–16. <https://doi.org/10.58803/fahn.v1i1.7>
- Bachmann, H., Autzen, S., Frey, U., Wehr, U., Rambeck, W., McCormack, H., Whitehead, C.C., 2013. The efficacy of a standardised product from dried leaves of *Solanum glaucophyllum* as source of 1,25-dihydroxycholecalciferol for poultry. *Br Poult Sci* 54, 642–652. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.825692>
- Baldock, P.A., Thomas, G.P., Hodge, J.M., Baker, S.U., Dressel, U., O'Loughlin, P.D., Nicholson, G.C., Briffa, K.H., Eisman, J.A., Gardiner, E.M., 2006. Vitamin D Action and Regulation of Bone Remodeling: Suppression of Osteoclastogenesis by the Mature Osteoblast. *Journal of Bone and Mineral Research* 21, 1618–1626. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060714>
- Bassi, L.S., Martins, C.C.S., Lozano-Poveda, C.A., Dias, I.C., Oliveira, S.G., Maiorka, A., 2025. Effect of 25-hydroxycholecalciferol and high phytase doses on performance, vitamin D status, bone mineralization, and mechanistic target of rapamycin gene expression of broilers. *animal* 19, 101353. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101353>
- Becker, L.L., Tokach, M.D., Woodworth, J.C., Goodband, R.D., DeRouchey, J.M., Devlikamov, M.R., Rahe, M.C., Siepker, C.L., Sithicharoenchai, P., Gebhardt, J.T., 2024. Influence of added 1,25(OH)₂D₃-glycoside on nursery pig growth performance, bone measurements, and cytokine concentrations. *Transl Anim Sci* 8. <https://doi.org/10.1093/tas/txae165>
- Brito, J.Á.G. de, Bertechini, A.G., Fassani, É.J., Rodrigues, P.B., Lima, E.M.C., Meneghetti, C., 2010. Efeito da vitamina D3 e 25-hidroxi-colecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 2656–2663. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001200014>
- Cao, S., Li, T., Shao, Y., Zhang, L., Lu, L., Zhang, R., Hou, S., Luo, X., Liao, X., 2021. Regulation of bone phosphorus retention and bone development possibly by related hormones and local bone-derived regulators in broiler chicks. *J Anim Sci Biotechnol* 12, 88. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00610-1>
- Çapar Akyüz, H., Onbaşlar, E.E., 2020. Non-infectious skeletal disorders in broilers. *Worlds Poult Sci J* 76, 611–623. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1759388>
- Castro, F.L. de S., Baião, N.C., Ecco, R., Louzada, M.J.Q., Melo, É. de F., Saldanha, M.M., Triginelli, M.V., Lara, L.J.C., 2018. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D3 level on broiler performance and bone quality. *Revista Brasileira de Zootecnia* 47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170186>
- Chen, Y., Ma, H., Du, Y., Dong, J., Jin, C., Tan, L., Wei, R., 2021. Functions of 1,25-dihydroxy vitamin D3, vitamin D3 receptor and interleukin-22 involved in pathogenesis of gout arthritis through altering metabolic pattern and inflammatory responses. *PeerJ* 9, e12585. <https://doi.org/10.7717/peerj.12585>
- Chen, Yuqi., Du, Youwei., Dong, Jianjian., Jin, Chenkai., Tan, Lihui., Wei, Rong., 2021. Functions of 1,25-dihydroxy vitamin D3, vitamin D3 receptor and interleukin-22 involved in pathogenesis of gout arthritis through altering metabolic pattern and inflammatory responses. *PeerJ* 9, e12585. <https://doi.org/10.7717/peerj.12585>
- Cheng, Y.H., Goff, J.P., Sell, J.L., Dallorso, M.E., Gil, S., Pawlak, S.E., Horst, R.L., 2004. Utilizing *Solanum glaucophyllum* Alone or with Phytase to Improve Phosphorus Utilization in Broilers. *Poult Sci* 83, 406–413. <https://doi.org/10.1093/ps/83.3.406>
- Chou, P.-C., Lin, P.-C., Wu, S.-W., Wang, C.-K., Chung, T.-K., Walzem, R.L., Lai, L.-S., Chen, S.-E., 2021. Differential Modulation of 25-hydroxycholecalciferol on Innate Immunity of Broiler Breeder Hens. *Animals* 11, 1742. <https://doi.org/10.3390/ani11061742>
- Chou, S.H., Chung, T.K., Yu, B., 2009. Effects of supplemental 25-hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. *Poult Sci* 88, 2333–2341. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00283>
- Christakos, S., Lieben, L., Masuyama, R., Carmeliet, G., 2014. Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep* 3. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.230>
- Colet, S., Garcia, R., Almeida Paz, I., Caldara, F., Borille, R., Royer, A., Nääs, I., Sgavioli, S., 2015. Bone characteristics of broilers supplemented with vitamin D. *Rev Bras Cienc Avic* 17, 325–332. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1703325-332>
- Dimitrov, V., Barbier, C., Ismailova, A., Wang, Y., Dmowski, K., Salehi-Tabar, R., Memari, B., Groulx-Boivin, E., White, J.H., 2021. Vitamin D-regulated Gene Expression Profiles: Species-specificity and Cell-specific Effects on Metabolism and Immunity. *Endocrinology* 162. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa218>
- DSM, 2022. Optimum Vitamin Nutrition® Guidelines., Nutrition Products. ed.

- Filgueiras, M.S., Rocha, N.P., Novaes, J.F., Bressan, J., 2020. Vitamin D status, oxidative stress, and inflammation in children and adolescents: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60, 660–669. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546671>
- Gao, S., Qiu, K., Zheng, J., Zhang, H., Wang, J., Qi, X., Wu, S., 2024. Dietary 25-Hydroxycholecalciferol Supplementation as a Vitamin D3 Substitute Improves Performance, Egg Quality, Blood Indexes, Jejunal Morphology, and Tibia Quality in Late-Phase Laying Hens. *Animals* 14, 878. <https://doi.org/10.3390/ani14060878>
- Geng, Y., Ma, Q., Wang, Z., Guo, Y., 2018. Dietary vitamin D3 supplementation protects laying hens against lipopolysaccharide-induced immunological stress. *Nutr Metab (Lond)* 15, 58. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0293-8>
- Han, J., Wu, L., Lv, X., Liu, M., Zhang, Y., He, L., Hao, J., Xi, L., Qu, H., Shi, C., Li, Z., Wang, Z., Tang, F., Qiao, Y., 2022. Intestinal segment and vitamin D3 concentration affect gene expression levels of calcium and phosphorus transporters in broiler chickens. *J Anim Sci Technol*. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e78>
- Hanel, A., Veldhuizen, C., Carlberg, C., 2022. Gene-Regulatory Potential of 25-Hydroxyvitamin D3 and D2. *Front Nutr* 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.910601>
- Hodnik, J.J., Ježek, J., Starič, J., 2020. A review of vitamin D and its importance to the health of dairy cattle. *Journal of Dairy Research* 87, 84–87. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000424>
- Hsiao, F.S.-H., Cheng, Y.-H., Han, J.-C., Chang, M.-H., Yu, Y.-H., 2018. Effect of different vitamin D3 metabolites on intestinal calcium homeostasis-related gene expression in broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia* 47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170015>
- Hui, Q., Zhao, X., O, K., Yang, C., 2022. Effects of Tryptophan and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Compact Bones of Broilers and Layers. *J Agric Food Chem* 70, 10476–10489. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03451>
- Ismailova, A., White, J.H., 2022. Vitamin D, infections and immunity. *Rev Endocr Metab Disord* 23, 265–277. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09679-5>
- Jabbar, A., Tahir, M., Naz, S., Alrefaei, A.F., Sultan, A., Abdelrahman, S., Selvaggi, M., 2024. Enhancing calcium and phosphorus utilization in broiler chickens through cholecalciferol in sequential calcium-phosphorus-deficient diets. *J Appl Anim Res* 52. <https://doi.org/10.1080/09712119.2024.2337177>
- Jacquillet, G., Unwin, R.J., 2019. Physiological regulation of phosphate by vitamin D, parathyroid hormone (PTH) and phosphate (Pi). *Pflugers Arch* 471, 83–98. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2231-z>
- Jaime, J., Vargas-Bermúdez, D.S., Yitbarek, A., Reyes, J., Rodríguez-Lecompte, J.C., 2020. Differential immunomodulatory effect of vitamin D (1,25(OH)2D3) on the innate immune response in different types of cells infected in vitro with infectious bursal disease virus. *Poult Sci* 99, 4265–4277. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.006>
- Jäpelt, R.B., Jakobsen, J., 2013. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00136>
- Jiang, S., Jiang, Z., Yang, K., Chen, F., Zheng, C., Wang, L., 2015. Dietary vitamin D3 requirement of Chinese, yellow-feathered broilers. *Poult Sci* 94, 2210–2220. <https://doi.org/10.3382/ps/pev163>
- Khan, K., Kaya, M., Fidan, E.D., Kilimci, F.S., 2023. Impact of litter on femur and tibial morphology, bone biomechanics, and leg health parameters in broiler chickens. *Anim Biosci* 36, 1393–1402. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0335>
- Khan, K., Sevil Kilimci, F., Kara, M., 2021. Biomechanical tests: applications and their reliability for the prediction of bone strength in broiler chicken. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University* 6, 85–92. <https://doi.org/10.24880/maeuvsd.936262>
- Khan, M.U., Gautam, G., Jan, B., Zahiruddin, S., Parveen, R., Ahmad, S., 2022. Vitamin D from Vegetable VV Sources: Hope for the Future. *Phytomedicine Plus* 2, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100248>
- Khan, R.U., Naz, S., Ullah, H., Khan, N.A., Laudadio, V., Ragni, M., Piemontese, L., Tufarelli, V., 2023. Dietary vitamin D: growth, physiological and health consequences in broiler production. *Anim Biotechnol* 34, 1635–1641. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2013861>
- Khan, S.H., Mukhtar, N., 2013. Dynamic role of cholecalciferol in commercial chicken performance. *Worlds Poult Sci J* 69, 587–600. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000597>
- Kheiri, F., Landy, N., 2019. The effects of dietary 1-alpha-hydroxycholecalciferol individually or in combination with different levels of cholecalciferol on growth performance and tibia criteria in broiler chickens. *Livest Sci* 221, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.02.007>
- Koivisto, O., Hanel, A., Carlberg, C., 2020. Key Vitamin D Target Genes with Functions in the Immune System. *Nutrients* 12, 1140. <https://doi.org/10.3390/nu12041140>
- Kulyar, M.F.-A., Yao, W., Mo, Q., Ding, Y., Zhang, Y., Gao, J., Li, K., Pan, H., Nawaz, S., Shahzad, M., Mehmood, K., Iqbal, M., Akhtar, M., Bhutta, Z.A., Waqas, M., Li, J., Qi, D., 2022. Regulatory Role of Apoptotic and Inflammasome Related Proteins and Their Possible Functional Aspect in Thiram Associated Tibial Dyschondroplasia of Poultry. *Animals* 12, 2028. <https://doi.org/10.3390/ani12162028>

- Kumar, R., Brar, R.S., Banga, H.S., 2017. Hypervitaminosis D3 in broiler chicks: histopathological, immunomodulatory and immunohistochemical approach. *Iran J Vet Res* 18, 170–176.
- Kumar, R., Singh Banga, H., Singh Brar, R., 2023. Effects of Dietary Vitamin D3 Over-Supplementation on Broiler Chickens' Health; Clinicopathological and Immunohistochemical Characteristics. *Journal of Veterinary Physiology and Pathology* 2, 20–31. <https://doi.org/10.58803/jvpp.v2i2.21>
- Lázaro, R., Mateos, G.G., 2008. FEDNA - Necesidades nutricionales para la avicultura: pollos de carne y aves de puesta. *Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA)* 1–73.
- Li, J., Ma, Y., Zhang, L., Cai, C., Guo, Y., Zhang, Z., Li, D., Tian, Y., Kang, X., Han, R., Jiang, R., 2023. Valgus-varus deformity induced abnormal tissue metabolism, inflammatory damage and apoptosis in broilers. *Br Poult Sci* 64, 26–35. <https://doi.org/10.1080/00071668.2022.2121640>
- Liao, X.D., Suo, H.Q., Lu, L., Hu, Y.X., Zhang, L.Y., Luo, X.G., 2017. Effects of sodium, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone fragment on inorganic P absorption and Type IIb sodium-phosphate cotransporter expression in ligated duodenal loops of broilers. *Poult Sci* 96, 2344–2350. <https://doi.org/10.3382/ps/pex033>
- Lim, C.I., Ryu, K.S., 2022. Interactive effect of dietary levels of calcium and 25-hydroxy vitamin D3 on the performance, serum biochemical concentration and digestibility of laying hens from 61 to 70 weeks of age. *Anim Biosci* 35, 1426–1433. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0003>
- Liu, M.Y., Wu, L.H., Lv, X.L., He, L., Hao, J.F., Ma, B.B., Xi, L., Qiao, Y.Y., Tang, F., Han, J.C., 2023. 25-hydroxycholecalciferol affects growth performance, bone calcium content and intestinal calcium transporter gene expression in broiler chickens. *J Anim Feed Sci* 32, 138–145. <https://doi.org/10.22358/jafs/157475/2023>
- Lopes, T.S.B., Shi, H., White, D., Araújo, I.C.S., Kim, W.K., 2024. Effects of 25-hydroxycholecalciferol on performance, gut health, and bone quality of broilers fed with reduced calcium and phosphorus diet during *Eimeria* challenge. *Poult Sci* 103, 103267. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103267>
- Lopes, Tainá Silva Brandão, Vasconcelos, M.D.C., Costa, B.T.A., Sousa, L.S., Bertassoli, B.M., Ocarino, N. de M., Serakides, R., Lara, L.J.C., Araújo, I.C.S., 2024. Performance and bone health of broilers reared under artificial lighting and supplemented with different levels of vitamin D3. *Revista Brasileira de Zootecnia* 53. <https://doi.org/10.37496/rbz5320210230>
- Lv, X., Hao, J., Wu, L., Liu, M., He, L., Qiao, Y., Cui, Y., Wang, G., Zhang, C., Qu, H., Han, J., 2022. Age quadratically affects intestinal calcium and phosphorus transporter gene expression in broiler chickens. *Anim Biosci* 35, 1921–1928. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0058>
- Mabelebele, M., 2017. Bone morphometric parameters of the tibia and femur of indigenous and broiler chickens reared intensively. *Appl Ecol Environ Res* 15, 1387–1398. https://doi.org/10.15666/aer/1504_13871398
- Martens, P.-J., Gysemans, C., Verstuyf, A., Mathieu, C., 2020. Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients* 12, 1248. <https://doi.org/10.3390/nu12051248>
- Martins, T.E., Gouvêa, V.N., Perdigão, A., Niehues, M.B., Martins, C.L., Millen, D.D., Acedo, T.S., Carvalho, V. V., Tamassia, L.F.M., Arrigoni, M.D.B., 2025. Effects of supplemental 25-hydroxyvitamin D3 on growth performance, physiological responses, and gene expression of skeletal muscle growth of finishing beef cattle. *J Anim Sci*. <https://doi.org/10.1093/jas/skaf090>
- Masuyama, R., Stockmans, I., Torrekens, S., Van Loooveren, R., Maes, C., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G., 2006. Vitamin D receptors in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation* 116, 3150–3159. <https://doi.org/10.1172/JCI29463>
- Mathis, G., Boland, R., Bachmann, H., Toggenburger, A., Rambeck, W., 2016. Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D3 of herbal origin in broiler chicken. *Schweiz Arch Tierheilkd* 158, 819–826. <https://doi.org/10.17236/sat00097>
- Metwally, M., Farghly, M., Sharaq, T., 2021. Effects of light regimens and vitamin d3 levels and their interactions on broilers growth performance and carcass traits. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds* 24, 171–185. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2021.170326>
- Meyer, M.B., Pike, J.W., 2020. Mechanistic homeostasis of vitamin D metabolism in the kidney through reciprocal modulation of Cyp27b1 and Cyp24a1 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 196, 105500. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105500>
- Morris, A., Shanmugasundaram, R., McDonald, J., Selvaraj, R.K., 2015. Effect of in vitro and in vivo 25-hydroxyvitamin D treatment on macrophages, T cells, and layer chickens during a coccidia challenge. *J Anim Sci* 93, 2894–2903. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8866>
- Nääs, I. de A., Baracho, M. dos S., Bueno, L., Moura, D. de, Vercelino, R. do A., Salgado, D., 2012. Use of vitamin D to reduce lameness in broilers reared in harsh environments. *Rev Bras Cienc Avic* 14, 165–172. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2012000300002>
- NCR, 1994. NCR - National Research Council. Nutrient Requirements for Poultry. National Academy Press 9.

- Nguyen-Yamamoto, L., Karaplis, A.C., St-Arnaud, R., Goltzman, D., 2017. Fibroblast Growth Factor 23 Regulation by Systemic and Local Osteoblast-Synthesized 1,25-Dihydroxyvitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology* 28, 586–597. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010066>
- Nunes, R.A., Duarte, M. de S., Campos, P.H.R.F., de Oliveira, L.L., e Silva, F.F., Kreuz, B.S., Mirabile, C.G., Borges, S.O., Calderano, A.A., 2020. Active vitamin D3-glycoside preserves weight gain and modulates the inflammatory response in broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Anim Feed Sci Technol* 270, 114704. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114704>
- Oliveira, R.P., Santos, E.T., Sgavioli, S., Garcia, R.G., Baraldi-Artoni, S.M., Faria, D.E., 2015. Níveis de vitamina D sobre o desempenho e desenvolvimento ósseo de linhagens de frangos de corte. *Ars Veterinaria* 31, 01. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2015v31n1p01-06>
- Pande, V. V., Chousalkar, K.C., Bhanugopan, M.S., Quinn, J.C., 2015. Super pharmacological levels of calcitriol (1,25-(OH)₂ D₃) inhibits mineral deposition and decreases cell proliferation in a strain dependent manner in chicken mesenchymal stem cells undergoing osteogenic differentiation in vitro. *Poult Sci* 94, 2784–2796. <https://doi.org/10.3382/ps/pev284>
- Perine, T., Grieser, D., Furlan, A., Ton, A., Benites, M., Zancanela, V., Stanquevis, C., Marcato, S., 2022. Calcium Requirement and Vitamin D Supplementation in Meat-Type Quail at First Stage of Growth. *Brazilian Journal of Poultry Science* 24. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1218>
- Priehl, B., Treiber, G., Pieber, T., Amrein, K., 2013. Vitamin D and Immune Function. *Nutrients* 5, 2502–2521. <https://doi.org/10.3390/nu5072502>
- 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, 609–627. <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00743>
- Rao, S.V.R., Raju, M.V.L.N., Panda, A.K., Sunder, G.S., Sharma, R.P., 2006. Effect of High Concentrations of Cholecalciferol on Growth, Bone Mineralization, and Mineral Retention in Broiler Chicks Fed Suboptimal Concentrations of Calcium and Nonphytate Phosphorus. *Journal of Applied Poultry Research* 15, 493–501. <https://doi.org/10.1093/japr/15.4.493>
- Ribeiro, M.V., Cristo, A.B. de, Bordignon, H.L.F., Simões, E.P., Bittencourt, L.C., Fernandes, J.I.M., 2021. Supplementation of minerals and vitamins in broiler diets: effect on performance and bone quality. *Ciência Animal Brasileira* 22. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-67656>
- Rodriguez-Lecompte, J.C., Yitbarek, A., Cuperus, T., Echeverry, H., van Dijk, A., 2016. The immunomodulatory effect of vitamin D in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels. *Poult Sci* 95, 2547–2556. <https://doi.org/10.3382/ps/pew186>
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Calderano, A.A., Hanas, M.I., Sakomura, N.K., Perazzo, F., Rocha, G.C., Saraiva, A., Abreu, M.L.T., Genova, J.L., Tavernari, F.C., 2024. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais, Suprema. ed. Visconde do Rio Branco.
- Rousseau, X., Valable, A.-S., Létourneau-Montminy, M.-P., Mème, N., Godet, E., Magnin, M., Nys, Y., Duclos, M.J., Narcy, A., 2016. Adaptive response of broilers to dietary phosphorus and calcium restrictions. *Poult Sci* 95, 2849–2860. <https://doi.org/10.3382/ps/pew172>
- Saini, R.K., Kaneko, I., Jurutka, P.W., Forster, R., Hsieh, A., Hsieh, J.-C., Haussler, M.R., Whitfield, G.K., 2013. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Expression in Bone Cells: Evidence for Primary and Secondary Mechanisms Modulated by Leptin and Interleukin-6. *Calcif Tissue Int* 92, 339–353. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9683-5>
- Sakkas, P., Smith, S., Hill, T.R., Kyriazakis, I., 2019. A reassessment of the vitamin D requirements of modern broiler genotypes. *Poult Sci* 98, 330–340. <https://doi.org/10.3382/ps/pey350>
- Schwarz, A., Navid, F., Sparwasser, T., Clausen, B.E., Schwarz, T., 2012. 1,25-Dihydroxyvitamin D Exerts Similar Immunosuppressive Effects as UVR but Is Dispensable for Local UVR-Induced Immunosuppression. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 2762–2769. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.238>
- Semenenko, M., Kuzminova, E., Semenenko, K., Vlasenko, A., Zholobova, I., 2021. Biochemical markers of bone tissue metabolism in broiler chickens. *E3S Web of Conferences* 273, 02016. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127302016>
- Setiyaningsih, N., Jayanegara, A., Wardani, W.W., 2023. Effects of a Vitamins D and C Supplement on Performance, Hatchability and Blood Profiles of Broiler Breeders. *J Worlds Poult Res.* <https://doi.org/10.36380/jwpr.2023.7>
- Shams, S., Kheiri, F., Landy, N., 2022. The effects of 1α(OH)D₃ individually or in combination with phytase, and different levels of cholecalciferol on performance, tibia criteria, and plasma minerals of Japanese quails. *Acta Sci* 44, e54218. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v44i1.54218>
- Shi, H., Chopra, V.S.R., Paneru, D., Kim, W.K., 2024. Effects of phytase and 25-hydroxycholecalciferol supplementation in broilers fed calcium-phosphorous deficient diets, with or without Eimeria challenge, on growth performance, body composition, bone development, and gut health. *Animal Nutrition* 19, 411–428. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.07.006>

- Shojadoost, B., Behboudi, S., Villanueva, A.I., Brisbin, J.T., Ashkar, A.A., Sharif, S., 2015. Vitamin D3 modulates the function of chicken macrophages. *Res Vet Sci* 100, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.009>
- Shojadoost, B., Yitbarek, A., Alizadeh, M., Kulkarni, R.R., Astill, J., Boodhoo, N., Sharif, S., 2021. Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. *Poult Sci* 100, 100930. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.027>
- Siegel, P.B., Barger, K., Siewerdt, F., 2019. Limb Health in Broiler Breeding: History Using Genetics to Improve Welfare. *Journal of Applied Poultry Research* 28, 785–790. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz052>
- Sousa, J. de, Albino, L., Vaz, R., Rodrigues, K., Da Silva, G., Renno, L., Barros, V., Kaneko, I., 2015. The effect of dietary phytase on broiler performance and digestive, bone, and blood biochemistry characteristics. *Rev Bras Cienc Avic* 17, 69–76. <https://doi.org/10.1590/1516-635x170169-76>
- Souza, C.S., Vieites, F.M., 2014. Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. *Archivos de Zootecnia* 63, 11–24. <https://doi.org/10.21071/az.v63i241.588>
- Souza, C.S., Vieites, F.M., Nunes, R.V., Brusamarello, E., Reis, T.L., Lima, C.A.R. de, Vargas Junior, J.G. de, 2020. Suplemento de 1,25-dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte fêmeas. *Research, Society and Development* 9, e19973975. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3975>
- St. John, H.C., Bishop, K.A., Meyer, M.B., Benkusky, N.A., Leng, N., Kendzierski, C., Bonewald, L.F., Pike, J.W., 2014. The Osteoblast to Osteocyte Transition: Epigenetic Changes and Response to the Vitamin D3 Hormone. *Molecular Endocrinology* 28, 1150–1165. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1091>
- Starkey, J.D., 2024. 172 Impact of maternal and postnatal 25-hydroxycholecalciferol supplementation on porcine and avian satellite cell mitotic activity and skeletal muscle growth characteristics. *J Anim Sci* 102, 209–210. <https://doi.org/10.1093/jas/skae234.245>
- Suarez, J.C., Knape, K., Ali, N.A., Aljuboori, J., Al-Alwani, T., Gutierrez, O., Carey, J.B., 2023. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol and its impact on performance, intestinal morphology, and vitamin D status in broilers subjected to coccidiosis vaccine. *Journal of Applied Poultry Research* 32, 100360. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2023.100360>
- Świątkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., Bederska-Lojewska, D., Józefiak, D., 2017. Efficacy of dietary vitamin D and its metabolites in poultry - review and implications of the recent studies. *Worlds Poult Sci J* 73, 57–68. <https://doi.org/10.1017/S0043933916001057>
- Taghizadeh, M., Esmaceli, H., Vakili, R., 2024. Cholecalciferol combined with Satureja rechingeri essential oils improves growth performance and immune response of broiler chickens. *Vet Med Sci* 10. <https://doi.org/10.1002/vms3.1587>
- Tahamtani, F.M., Herskin, M.S., Foldager, L., Murrell, J., Sandercock, D.A., Riber, A.B., 2021. Assessment of mobility and pain in broiler chickens with identifiable gait defects. *Appl Anim Behav Sci* 234, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105183>
- Tang, J., Zhuang, L., Li, Y., Luo, D., Guo, Z., Wang, S., Cao, J., Wang, M., Zhou, Z., Xie, M., Hou, S., 2025. Vitamin D3 requirements and relative bioavailability for starter male White Pekin ducks fed either cholecalciferol or 25-hydroxycholecalciferol. *Poult Sci* 104, 104525. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104525>
- Tay-Zar, A.C., Srichana, P., Sadiq, M.B., Anal, A.K., 2019. Restriction of dietary non-phytate phosphorus on growth performance and expression of intestinal phosphate cotransporter genes in broilers. *Poult Sci* 98, 4685–4693. <https://doi.org/10.3382/ps/pez171>
- Tian, R., Li, X., Li, Y., Wang, K., Wang, C., Yang, P., 2018. 1,25(OH)2D3 promotes chondrocyte apoptosis and restores physical function in rheumatoid arthritis through the NF-κB signal pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.061>
- Trautenmüller, H., Genova, J.L., Faria, A.B.B. de, Martins, J.S., Viana, S.C.M., Castilha, L.D., Gonçalves, A.C., Baraldi-Artori, S.M., Carvalho, P.L. de O., 2021. Bone traits and gastrointestinal tract parameters of piglets fed cholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside. *Revista Brasileira de Zootecnia* 50. <https://doi.org/10.37496/rbz5020210098>
- Trautenmüller, H., Genova, J.L., Santos, L.B. de A. dos, Leal, I.F., Santos, G. de B., Rupolo, P.E., Nunes, R.V., Oliveira, E.R. de, Carvalho, P.L. de O., 2022. Partial cholecalciferol replacement with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside in diets for piglets. *Anim Prod Sci* 62, 1590–1599. <https://doi.org/10.1071/AN21150>
- Upadhaya, S.D., Chung, T.K., Jung, Y.J., Kim, I.H., 2022. Dietary 25(OH)D3 supplementation to gestating and lactating sows and their progeny affects growth performance, carcass characteristics, blood profiles and myogenic regulatory factor-related gene expression in wean-finish pigs. *Anim Biosci* 35, 461–474. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0304>
- Vazquez, J.R., Gómez, G. V., López, C.C., Cortés, A.C., Díaz, A.C., Fernández, S.R.T., Rosales, E.M., Avila, A.G., 2018. Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 102. <https://doi.org/10.1111/jpn.12715>
- Veldurthy, V., Wei, R., Oz, L., Dhawan, P., Jeon, Y.H., Christakos, S., 2016. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res* 4, 16041. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.41>

- Vieites, F.M., Brusamarello, E., Corrêa, G. da S.S., Souza, C.S., De Oliveira, C.F.S., De Moraes, G.H.K., Caramori Júnior, J.G., 2018. 1,25-dihidroxicolecalciferol de origem herbal (*Solanum glaucophyllum*) mantém o desempenho e a qualidade óssea de frangos de corte fêmeas durante restrição de cálcio e fósforo. *Archivos de Zootecnia* 67, 414–419. <https://doi.org/10.21071/az.v67i259.3799>
- Vieites, F.M., Drosghic, L.C.A.B., Souza, C.S., Lima, C.A.R., Moraes, G.H.K., Nunes, R.V., Vasconcellos, C.H.F., Vargas Júnior, J.G., 2017. 1,25-dihidroxitamina-D 3 sobre as características ósseas de frangos de corte fêmeas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 69, 1285–1293. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9371>
- Vieites, F.M., Drosghic, L.C.A.B., Souza, C.S., Vargas Júnior, J.G., Nunes, R.V., Moraes, G.H.K. de, Corrêa, G.S.S., Caramori Júnior, J.G., 2016. Características ósseas de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semin Cienc Agrar* 37, 381. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p381>
- Vieites, F.M., Nalon, R.P., Santos, A.L., Castelo Branco, P.A., Souza, C.S., Nunes, R.V., Calderano, A.A., Arruda, N.V.M. de, 2014. Desempenho, rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semin Cienc Agrar* 35, 1617. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n3p1617>
- Wang, H., Wang, X., Zhan, Y., Peng, B., Zhang, H., Wang, W., Yang, L., Zhu, Y., 2022. Dietary Vitamin D & Requirement of Magang Goslings Aged from 1 to 21 D. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4279236>
- Warren, M.F., Livingston, K.A., 2021. Implications of Vitamin D Research in Chickens can Advance Human Nutrition and Perspectives for the Future. *Curr Dev Nutr* 5, nzab018. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab018>
- Wei, J., Li, L., Peng, Y., Luo, J., Chen, T., Xi, Q., Zhang, Y., Sun, J., 2024. The Effects of Optimal Dietary Vitamin D3 on Growth and Carcass Performance, Tibia Traits, Meat Quality, and Intestinal Morphology of Chinese Yellow-Feathered Broiler Chickens. *Animals* 14, 920. <https://doi.org/10.3390/ani14060920>
- Wu, L., Wang, X., Lv, X., He, L., Qu, H., Shi, C., Zhang, L., Zhang, J., Wang, Z., Han, J., 2022a. 1,25-Dihydroxycholecalciferol Improved the Growth Performance and Upregulated the Calcium Transporter Gene Expression Levels in the Small Intestine of Broiler Chickens. *J Poult Sci* 59, 0210019. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210019>
- Yang, L.-P., Dong, Y.-P., Luo, W.-T., Zhu, T., Li, Q.-W., Zhang, L.-J., Kong, J., Yuan, Z.-W., Zhao, Q., 2018. Tissue-Specific Regulatory Effects of Vitamin D and Its Receptor on Calbindin-D28K and Calbindin-D9K. *Biochem Mol Biol J* 04. <https://doi.org/10.21767/2471-8084.100072>
- Yavaş, İ., Çenesiz, A.A., Ceylan, N., 2020. Effects of Herbal Vitamin D3 and Phytase Supplementation to Broiler Feed on Performance, Bone Development and Serum Parameters of Broilers. *Tarım Bilimleri Dergisi*. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.479182>
- Yu, Y., Li, Q., Zhang, H., Wu, Y., Zhang, R., Yue, M., Yang, C., Cao, G., 2022. *Clostridium butyricum* alone or combined with 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 improved early-stage broiler health by modulating intestinal flora. *J Appl Microbiol* 132, 155–166. <https://doi.org/10.1111/jam.15180>
- Zanuzzi, C.N., Nishida, F., Portiansky, E.L., Fontana, P.A., Gimeno, E.J., Barbeito, C.G., 2012. Effects of *Solanum glaucophyllum* toxicity on cell proliferation and apoptosis in the small and large intestine of rabbits. *Res Vet Sci* 93, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.018>
- Zhang, L., Lu, L., Li, S., Zhang, G., Ouyang, L., Robinson, K., Tang, Y., Zhu, Q., Li, D., Hu, Y., Liu, Y., 2016. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Induces Avian β -Defensin Gene Expression in Chickens. *PLoS One* 11, e0154546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154546>
- Zhou, X.Y., Chen, X.C., Fraley, G.S., Zhang, K.Y., Tian, G., Bai, S.P., Ding, X.M., Wang, J.P., Lv, L., Xuan, Y., Zeng, Q.F., 2023. Effects of different dietary vitamin D combinations during the grower phase and the feed restriction phase on growth performance and sternal morphology, mineralization, and related genes expression of bone metabolism in Pekin ducks. *Poult Sci* 103291. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103291>

1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) na dieta de matrizes e sua influência no crescimento de frangos de corte

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) sobre o desempenho, rendimento de carcaça, cortes, histomorfometria intestinal, saúde óssea e a expressão gênica de frangos provenientes de matrizes suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G. Um total de 1.152 pintos machos de um dia da linhagem Ross 308 AP foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 × 3. Um dos fatores experimentais foi a suplementação ou não de 1,25(OH)₂D₃-G (0 ou 100 mg/kg) na dieta das matrizes entre 21 e 30 semanas de idade. O segundo fator experimental consistiu em três níveis de suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G (0, 50 e 100 mg/kg) na dieta dos frangos do 1º ao 21º dia, seguida de uma dieta comercial do 22º ao 42º dia. O estudo contou com seis tratamentos, oito repetições e 24 aves por unidade experimental. O desempenho, o rendimento de carcaça e cortes, assim como a resistência à quebra e a composição da tíbia, foram avaliados aos 21 e 42 dias. A histomorfometria intestinal e a expressão gênica foram analisadas aos 21 dias, enquanto a discondroplasia tibial foi avaliada aos 42 dias. Os frangos provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram maior peso ao nascimento, melhor conversão alimentar, histomorfometria intestinal e maior rendimento de carcaça. No entanto, essa suplementação não aumentou a deposição de cálcio e fósforo na tíbia, resultando em menor resistência óssea. Conclui-se que frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G apresentam melhor desempenho aos 21 e 42 dias.

Palavras-chave: Rendimento de carcaça, desempenho, saúde intestinal, saúde tibial.

1,25-Dihydroxycholecalciferol glycoside (1,25(OH)₂D₃-G) in broiler breeder diets and its influence on broiler chicken growth

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of supplementation with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside (1,25(OH)₂D₃-G) on performance, carcass and cuts yield, intestinal histomorphometry, bone health, and gene expression in broilers from breeders that were either supplemented or not supplemented with 1,25(OH)₂D₃-G. A total of 1,152 one-day-old male chicks of the Ross 308 AP strain were distributed in a completely randomized design in a 2 × 3 factorial arrangement. One experimental factor was the inclusion or absence of 1,25(OH)₂D₃-G supplementation (0 or 100 mg/kg) in the diets of breeders between 21 and 30 weeks of age. The second factor consisted of three levels of 1,25(OH)₂D₃-G supplementation (0, 50, and 100 mg/kg) in the broiler diets from day 1 to 21, followed by a commercial diet from day 22 to 42. The study comprised six treatments, with eight replicates and 24 birds per experimental unit. Performance, carcass and cuts yield, as well as tibial breaking strength and composition, were evaluated at 21 and 42 days. Intestinal histomorphometry and gene expression were analyzed at 21 days, while tibial dyschondroplasia was assessed at 42 days. Broilers from breeders supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G showed higher hatch weight, better feed conversion, improved intestinal histomorphometry, and greater carcass yield. However, this supplementation did not increase calcium and phosphorus deposition in the tibia, resulting in lower bone strength. It is concluded that broilers from breeders supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G show improved performance at both 21 and 42 days of age.

Keywords: Carcass yield; performance; intestinal health; tibial health.

INTRODUÇÃO

O 1,25-diidroxicolecalciferol glicosídeo, derivado da planta *Solanum glaucophyllum*, surgiu como uma alternativa promissora nas dietas de frangos de corte como fonte de vitamina D₃ (Vieites et al., 2016, 2018; Nunes et al., 2020). Diferentemente das formas lipossolúveis de vitamina D₃, que dependem da formação de micelas para transporte e absorção no intestino, o 1,25-diidroxicolecalciferol glicosídeo, devido à sua ligação glicosídica, possui propriedades solúveis em água, dissolvendo-se facilmente nos fluidos intestinais e eliminando a necessidade de micelas para seu transporte (Souza et al., 2020; Asnayanti et al., 2024).

Estudos indicam que a inclusão dietética de 1,25-diidroxicolecalciferol glicosídeo tem sido associada ao aumento da taxa de deposição de tecido muscular e à melhoria da eficiência de conversão alimentar, ambos essenciais para o desempenho produtivo (Vieites et al., 2016, 2017, 2018; Alves et al., 2018). No sistema imunológico, há evidências de que o 1,25-diidroxicolecalciferol glicosídeo pode modular a resposta inflamatória, promover a diferenciação de células imunes e melhorar a resistência das aves aos desafios sanitários (Nunes et al., 2020). Além disso, seu papel na regulação da homeostase de cálcio e fósforo tem se mostrado essencial para a mineralização óssea adequada, prevenindo distúrbios esqueléticos como a discondroplasia tibial, que comprometem a integridade estrutural das aves (Yavaş et al., 2020; Asnayanti et al., 2024).

Por outro lado, não há estudos sobre o uso de 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes de frangos de corte. No entanto, pesquisas sobre a suplementação de vitamina D₃ (colecalfiferol) sugerem que ela melhora o transporte de nutrientes para os ovos, resultando em frangos de corte com maior mineralização óssea e melhor capacidade de sustentar o peso durante o crescimento (Wen et al., 2019; Adhikari et al., 2020; Li et al., 2021; Yusuf et al., 2023). Isso sugere que a suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes de frangos de corte poderia gerar resultados ainda mais favoráveis, dado o potencial deste composto de atuar mais rapidamente nos organismos das aves, o que ressalta a necessidade de mais pesquisas para explorar seus efeitos e otimizar seus benefícios (Vieites et al., 2016, 2018; Nunes et al., 2020; Asnayanti et al., 2024).

Nesse contexto, estudar o 1,25(OH)₂D₃ de origem vegetal como alternativa à forma sintética é relevante, especialmente devido ao seu custo mais baixo e ao potencial para uma absorção mais eficiente nas aves (Souza et al., 2020; Kumar et al., 2023). No entanto, ainda não há consenso sobre sua dosagem ideal para frangos de corte (Nunes et al., 2020; Wu et al., 2022; Setiyaningsih et al., 2023), e o uso excessivo pode levar a complicações como hipercalcemia e calcificação excessiva, comprometendo a saúde e o bem-estar das aves (Gili et al., 2016; Alves et al., 2018; Trautenmüller et al., 2021, 2022). Portanto, mais estudos são necessários para estabelecer diretrizes seguras e avaliar sua eficácia na produção avícola (Hurst et al., 2020; Barnkob et al., 2020; San et al., 2021; Wang et al., 2021).

Portanto, este estudo propõe a hipótese de que a suplementação de matrizes com 1,25(OH)₂D₃-G melhora a mineralização óssea em frangos de corte recém-nascidos, promovendo um crescimento equilibrado e um sistema imunológico fortalecido. Para testar essa hipótese, o estudo avaliou os efeitos da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G no desempenho, rendimento de carcaça, cortes, histomorfometria intestinal, saúde óssea e expressão gênica em frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas ou não com esse metabólito.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de Ética

Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - UNIOESTE (Protocolo nº 01/2021) e foram previamente sancionados pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, em conformidade com a Norma nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

Aves, alojamento e delineamento experimental

Dois galpões de matrizes (G1 e G2) foram construídos no município de Pato Branco, Paraná, Brasil, com o objetivo de abrigar 8.000 matrizes de frangos de corte da linha AP95 (Aviagen) com 21 semanas de idade. Os galpões eram idênticos em termos de características físicas, e as práticas de manejo foram padronizadas para ambas. Cada galpão media 175 m x 13 m, foi construído com estrutura metálica, coberta com telhado de Brasilit, e possuía altura de teto de 3 metros, sem isolamento. Os galpões foram equipados com telas e cortinas brancas, além de ventiladores para manter a ventilação por pressão positiva. Os ninhos eram mecânicos, enquanto o sistema de alimentação consistia em alimentadores automáticos, especificamente projetados para matrizes de frangos de corte, e os bebedouros eram do modelo pendular.

As dietas fornecidas às matrizes nos galpões (G1 e G2) eram idênticas, formuladas com milho e farelo de soja para atender às necessidades nutricionais durante todo o período produtivo (21 a 30 semanas de idade). No entanto, as matrizes de frango de corte do G1 receberam uma dieta farelada suplementada com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dosagem de 100 mg/kg, a partir das 21 semanas de idade, enquanto as matrizes do G2 receberam uma dieta farelada sem suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Tanto as matrizes do G1 quanto G2 foram mantidas nas condições ambientais, com temperatura e umidade controladas, seguindo práticas padrão de manejo para matrizes de frangos de corte.

Com 30 semanas de idade, os ovos de cada galpão foram coletados separadamente, identificados, selecionados e higienizados. Em seguida, os ovos foram incubados em incubadoras (Jamesway série Platinum) onde permaneceram por um período de 18 dias, mantidos a uma temperatura de 37,5°C e umidade relativa de 60%. Após os 18 dias de incubação, os ovos foram transferidos para os nascedouros, onde permaneceram a uma temperatura de 37,2°C e umidade relativa de 65% até ocorrer a eclosão dos ovos.

Após o nascimento, os pintos de corte de um dia foram sexados e vacinados para as doenças de Marek, Bouda Aviária, Gumboro e bronquite infecciosa no incubatório. Em seguida,

foram identificados com base na origem das matrizes, considerando a suplementação ou não de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, e posteriormente, foram encaminhados ao Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon, Paraná - Brasil.

Um total de 1152 pintos de corte, machos, de um dia, da linhagem Ross 308 AP95, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2×3 . Um dos fatores considerou a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes (0,0 e 100 mg/kg) e o outro, três níveis (0,0; 50 e 100 mg/kg) de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte, totalizando seis tratamentos, com oito repetições de 24 aves por unidade experimental. O desempenho, rendimento de carcaça e cortes, bem como resistência à quebra tibial e a composição óssea, foram avaliados aos 21 e 42 dias. A histomorfometria intestinal e a expressão gênica também foram avaliadas aos 21 dias, enquanto a discondroplasia tibial foi analisada aos 42 dias.

As aves foram mantidas em um aviário experimental com dimensões de 35 metros de comprimento por 13 metros de largura, dividido em seções contendo múltiplas unidades experimentais. Cada unidade experimental tinha uma área de $1,96 \text{ m}^2$ e estava equipada com comedouro tubular, bebedouros do tipo *nipple* e piso de concreto. O controle da temperatura ambiente foi realizado pelo painel Smaai IV, que operava a fornalha de aquecimento a *pellets*, os quatro exaustores e os painéis evaporativos. O programa de iluminação seguiu as diretrizes do manual da linhagem. A refrigeração do ambiente e a renovação do ar eram asseguradas pelos exaustores e painéis evaporativos. As temperaturas média, mínima e máxima, assim como a umidade relativa, foram monitoradas diariamente e mantidas dentro da faixa de conforto térmico recomendada para cada fase.

Dietas e manejo alimentar

As dietas experimentais (Tabela 1) foram isonutritivas e isocalóricas, baseadas em milho e farelo de soja, conforme as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2017).

Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (g kg^{-1})	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Terminação
Milho (7,88%)	504,76	525,03	589,79	645,33
Farelo de soja (46%)	423,88	402,13	333,75	286,41
Óleo de soja degomado	29,70	33,66	39,07	36,54
Fosfato bicálcico	17,86	16,37	15,04	11,34
Calcário calcítico	9,39	8,64	8,62	7,16
Sal comum	4,02	3,68	3,36	3,37
Bicarbonato de sódio	1,00	1,50	2,00	2,00
Lisina sulfato (60%)	1,70	1,75		
Lisina sulfato (54,7%)			2,20	2,43

DL-Metionina (99%)	3,27	3,09	2,58	2,23
L-Treonina (99%)	0,47	0,42	0,31	0,24
Cloreto de colina (60%)	0,50	0,50	0,50	0,45
Adsorvente ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix vitamínico ²	1,30	1,00	1,00	1,00
Premix mineral ³	0,50	0,50	0,50	0,50
Coccidiostático ⁴	0,55	0,55	0,20	
Enramicina ⁵		0,08	0,08	
Inerte (caulim) ⁶	0,10	0,10		
Energia metab. (kcal kg ⁻¹)	3000	3050	3150	3200
Proteína bruta (g kg ⁻¹)	240,471	231,848	205,060	187,327
Lisina digestível (g kg ⁻¹)	13,000	12,50	11,000	10,000
Met. + Cist. digestível (g kg ⁻¹)	9,620	9,250	8,140	7,400
Treonina digestível (g kg ⁻¹)	8,580	8,250	7,260	6,600
Valina digestível (g kg ⁻¹)	10,000	9,630	8,470	7,700
Trp. digestível (g kg ⁻¹)	2,804	2,688	2,323	2,077
Arginina digestível (g kg ⁻¹)	15,196	14,573	12,619	11,302
Cálcio (g kg ⁻¹)	9,500	8,780	8,220	6,610
Fósforo disponível (g kg ⁻¹)	4,500	4,190	3,840	3,090
Sódio (g kg ⁻¹)	2,000	2,000	2,000	2,000
Potássio (g kg ⁻¹)	9,372	9,039	7,995	7,306

¹Adsorvente – bentonita. ²Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta na ração pré-inicial: Vitamina A (min) 14.300 U.I.; Vitamina D₃ (min) 5.200 U.I.; Vitamina E (min) 71,50 U.I.; Vitamina K₃ (min) 3,90 mg; Vitamina B₁ (min) 2,99 0mg; Vitamina B₂ (min) 9,10 mg; Ácido pantotênico (min) 15,60 mg; Vitamina B₆ (min) 5,20 mg; Vitamina B₁₂ (min) 32,50 mg; Ácido nicotínico (min) 78,00 mg; Ácido fólico (min) 2,60 mg; Biotina (min) 0,33 mg; Selênio (min) 0,39 mg. Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta nas dietas inicial, crescimento e terminação: Vitamina A 11.000 UI; Vitamina D₃ 4.000 UI; Vitamina E 55 UI; Vitamina K₃ 3,00 mg; Tiamina (B₁) 2,30 mg; Riboflavina (B₂) 7,00 mg; Piridoxina (B₆) 4,00 mg; Cianocobalamina (B₁₂) 25,00 mg; Ácido pantotênico (B₅) 12,00 mg; Niacina (B₃) 60,00 mg. Ácido fólico (B₉) 2,00 mg. Biotina (B₇) 0,25 mg. Selênio 0,30 g. ³Suplemento mineral, composição por kg de dieta: Ferro (min) 50g; Cobre (min) 10g; Manganês (min) 65g; Zinco (min) 65g; Iodo (min) 1000 mg. ⁴Anticoccidiano: de 1 a 21 dias de idade utilizado salinomicina 12% (Coxistac 12%) e de 22 a 35 dias de idade salinomicina 24% (Salinocox 24%). ⁵Enramicina 8% (Enradin 8%). ⁶Inerte a base de caulim, sendo a inclusão do 1,25(OH)₂D₃-G em função da substituição de peso por peso pelo inerte.

O uso de 1,25(OH)₂D₃-G substituiu o material inerte na ração (g g⁻¹). O 1,25(OH)₂D₃-G foi fornecido apenas até os 21 dias de idade. Após esse período, os frangos receberam as mesmas dietas de crescimento e terminação sem 1,25(OH)₂D₃-G. Durante o período experimental (1 a 42 dias), as aves tiveram acesso *ad libitum* a água e ração. Esse período de suplementação foi escolhido com base em evidências que indicam que, durante os primeiros 21 dias de vida, os frangos de corte apresentam uma alta demanda metabólica por cálcio e fósforo, enquanto a conversão endógena da vitamina D₃ em sua forma ativa ainda é limitada (Vieites et al., 2016, 2018; Alves et al., 2018).

Tratamentos e descrição do produto

Os tratamentos avaliados para o crescimento de frangos de corte, provenientes de matrizes não suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G, consistiram na inclusão de 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta. Para os frangos de corte provenientes de matrizes

suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, os tratamentos consistiram na adição de 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G.

A vitamina utilizada neste estudo (1,25(OH)₂D₃-G) é proveniente do produto Panbonis® 10, produzido a partir de *Solanum glaucophyllum*, na forma em pó, padronizado com amido de trigo pré-gelatinizado e farelo de trigo. Sua composição analítica inclui 1,25(OH)₂D₃-G (mínimo de 10 ppm), umidade (máximo de 14%), proteína bruta (14-18%), fibra bruta (5,25-8,75%), gordura bruta (3-6%), cinza bruta (3-6%), sódio (0,0-0,7%), lisina (0,6-0,9%) e metionina (0,2-0,4%).

Desempenho, rendimento de carcaça e cortes

O peso corporal e o consumo de ração das aves foram registrados aos 10, 21 e 42 dias para avaliar o ganho de peso corporal, o consumo de ração e a conversão alimentar. O ganho de peso foi calculado como a diferença entre o peso corporal final e o inicial das aves durante o período avaliado. O consumo de ração foi determinado dividindo-se o total de ração consumida pelo número de aves vivas no período. A conversão alimentar foi calculada como o total de ração consumida dividido pelo ganho de peso das aves e foi ajustada pela mortalidade, conforme descrito por Sakomura e Rostagno (2016).

Aos 42 dias de idade, três aves por unidade experimental, foram selecionadas aleatoriamente, pesadas, identificadas e eutanasiadas, por eletronarcose seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração. As carcaças foram inicialmente pesadas, em seguida, foram resfriadas em água e gelo por 60 minutos e submetidas a um período de gotejamento de 10 minutos, para remover o excesso de água. Posteriormente, as carcaças resfriadas foram pesadas para calcular o rendimento da carcaça fria. Em seguida, foram espostejadas, separando-se as pernas (coxa e sobrecoxa), asas, filé de peito e sassami, sendo cada corte pesado individualmente.

O rendimento da carcaça foi calculado a partir do peso da carcaça em relação ao peso vivo da ave. Já o rendimento dos cortes foi determinado com base no peso dos cortes em relação ao peso da carcaça fria. O fígado e a gordura abdominal (constituída pelo tecido adiposo presente ao redor da cloaca, moela, pro ventrículo e dos músculos abdominais adjacentes) foram separados e pesados para determinar o peso relativo deles em função do peso vivo da ave.

Histomorfometria intestinal

Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental foi eutanasiada por deslocamento cervical para retirada do aparelho digestório para avaliação da morfometria

intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta, área de absorção e relação vilo: cripta). O intestino delgado foi exposto e o jejuno foi separado para a amostragem. No jejuno, o segmento foi da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Coletou-se um fragmento de 2 cm do jejuno, a 5 cm antes do divertículo de Meckel. Esse fragmento foi fixado em solução de formalina tamponada (10%), desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em parafina. Em seguida, cortes semisseriados de 5 µm de cada segmento foram dispostos em lâminas de vidro e corados utilizando a técnica de hematoxilina-eosina, conforme descrito por Luna (1968).

As medições foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE 4.1. Em cada lâmina, foram registrados o comprimento e a largura dos vilos, assim como a profundidade e a largura das criptas. Essas medidas morfométricas foram utilizadas para calcular a área da superfície de absorção da mucosa intestinal, seguindo a fórmula descrita por Kisielinski et al. (2002). Com os resultados de altura de vilo e profundidade de cripta foi calculada a relação vilo:cripta.

Resistência a quebra da tíbia e sua composição

As tíbias dos frangos de corte eutanasiados aos 21 e 42 dias de idade foram utilizadas para determinar a matéria seca em estufa com circulação de ar (105°C). Após esse processo, as tíbias foram calcinadas por 8 horas em forno mufla a 600°C para obtenção da matéria mineral (cinza). Os teores de cálcio e fósforo no osso foram determinados conforme descrito por Silva e Queiroz (2009). A concentração de cálcio foi medida por espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS), e o fósforo (P) foi medido utilizando espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS).

A tíbia esquerda foi utilizada para determinar a resistência óssea utilizando o analisador de textura Brookfield CT3. Este equipamento possui uma base que suporta as áreas epifisárias do osso, aplicando uma força de 5 mm/s com uma carga de 200 kgf (quilograma-força) na região central do osso (diáfise). Durante a determinação da força, a tíbia foi posicionada sobre o suporte sempre na mesma posição. Os resultados foram expressos em quilograma-força (Ospina-Rojas et al., 2018).

Discondroplasia tibial

Aos 42 dias de idade, após a avaliação da resistência óssea, a tíbia esquerda foi utilizada para avaliar os graus de discondroplasia tibial, seguindo o método descrito por Edwards (1989).

Foi feito um corte transversal na parte superior da tíbia para expor a porção central do osso, a fim de avaliar os escores das lesões de acordo com o grau de cartilagem:

- 0: Cartilagem normal, estreita e com pequenas irregularidades;
- 1: Cartilagem espessada ou com irregularidades consideráveis;
- 2: Cartilagem espessada, com evidência de cartilagem pré-hipertrófica que não está calcificada e não foi invadida por vasos da metáfise, irregularidades profundas dessa cartilagem são aparentes;
- 3: Grande massa de cartilagem na extremidade proximal da tíbia.

Expressão gênica

A expressão gênica das interleucinas (IL-10 e IL-1 β) foram analisadas para avaliar seu papel na resposta imune, enquanto o CALB-D28K (Calbindina-D28K) foi avaliado para sua função no metabolismo do cálcio. Como o 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G regula tanto a homeostase do cálcio quanto a modulação imunológica, seus efeitos sobre esses genes ajudam a entender seu impacto nos frangos de corte. Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental recebeu estímulo através da administração intraperitoneal de 1 mg de LPS (lipopolissacarídeos de *E. coli*, Sigma) por peso corporal. Após 4 horas, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, imediatamente, um fragmento do jejuno foi coletado e imerso na solução estabilizadora RNAlater™ (Invitrogen, EUA), que foi posteriormente armazenada em um freezer a -20°C até a extração de RNA.

O RNA total foi extraído utilizando o *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen GmbH, Germany). Aproximadamente 70 mg de intestino de frango foi pesado, triturado e adicionado em microtubo, livre de DNase e RNase, contendo 500 μ L de Trizol. As amostras foram homogeneizadas (vórtex), incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 100 μ L de clorofórmio foi adicionado, seguido de homogeneização manual por 15 segundos. Após isso, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12.000 $\times$ g, a 4°C.

A fase aquosa foi coletada em novo tubo, e adicionado 250 μ L de isopropanol, seguido por incubação por 10 minutos (temperatura ambiente) com homogeneização manual e centrifugação por 15 minutos a 12000 $\times$ g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a 7500 $\times$ g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado para a secagem do *pellet*, por 15 minutos, e então ressuspensas em água ultrapura livre de DNase e RNase e incubadas a 60°C por 15 minutos.

A concentração de RNA para as interleucinas (IL-1 β e IL-10), calbindina-D28K (CALB-D28K) e β -actina (gene para controle endógeno) foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA), no comprimento de onda de 260/280 nm, e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Safe™ DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) e visualizada em aparelho transiluminador com luz ultravioleta.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com as normas do fabricante, considerando 1 μ g de RNA e volume final de 20 μ L. Para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, cada amostra foi tratada com 2 μ L de *gDNA Wipeout Buffer* (Qiagen GmbH, Germany) e incubada a 45°C por 2 min. Após remoção do DNA genômico, foi adicionado 4 μ L *Quantiscript RT Buffer*, 1 μ L *RT Primer Mix Reverse Transcription Mix* e 1 μ L *Quantiscript Reverse Transcriptase*. A reação de transcriptase reversa foi incubada por 15 min a 42°C, seguida de 95°C por 3 min, sendo imediatamente colocada no gelo. As amostras foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenadas a -20°C até o momento do uso. Os *primers*/oligonucleotídeos utilizados nas reações foram obtidos a partir de trabalhos publicados de *Gallus gallus* (Tabela 2). As sequências dos *primers* foram alinhadas utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O gene da β -actina foi considerada como gene de referência/*housekeeping*, e sua estabilidade entre os tratamentos foi avaliada utilizando o programa *Statistica*® 7.0.

Tabela 2. Genes e sequências de primers.

Gene	Sequência de primers (5'→3')	Tamanho do amplicon (bp)	Referências
β -actina	F: TTCTTTTGGCGCTTGACTCA R: GCGTTCGCTCCAACATGTT	88	Proszkowiec-Weglarz <i>et al.</i> (2019)
CALB-D28K	F: TTGGCACTGAAATCCCACTGAA R: CATGCCAAGACCAAGGCTGA	116	NM_205513.2
IL-1 β	F: GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG R: TGTCGATGTCCCGCATGA	80	NM_204524.2
IL-10	F: CATGCTGCTGGGCCTGAA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	94	NM_001004414.4

Nota: CALB-D28K: Calbindina D28K; IL-1 β : Interleucina 1 beta; IL-10: Interleucina 10.

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada *primer*, foi realizado diluições seriadas do *pool* de amostras de cDNA contendo todos os tratamentos, utilizando diferentes concentrações dos iniciadores. Para β -actina, CALB-D28K e IL-10 foi considerado 200 ng de cDNA e 400 nM de *primer*, e para IL-1 β , 200 ng cDNA e 600 nM de *primer*.

As análises de qRT-PCR foram conduzidas em Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germany), utilizando o *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* (Qiagen GmbH, Germany) em duplicatas. O volume total da reação foi de 20 µl. As condições de amplificação foram: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 seg, e 60°C por 10 seg. A curva de dissociação (*melt curve*) dos produtos da reação foi obtida, para determinar a especificidade das reações.

Os dados de expressão gênica relativa foram registrados como valores de Ct (cycle threshold) e foram normalizados utilizando a média dos valores de Ct obtidos para o gene de referência em cada amostra, para cada tratamento e para cada gene alvo, conforme recomendado por Vandesompele et al. (2002). O método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usado para quantificação relativa da expressão gênica (expressa como unidades arbitrárias, AU).

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade residual utilizando o teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias utilizando o teste de Levene, ambos realizados por meio do procedimento Univariate. Para os dados com distribuição normal, foi realizada uma análise de variância de dois fatores (ANOVA) para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes e frangos de corte, bem como as possíveis interações entre esses fatores. Quando efeitos significativos foram detectados, as médias dos tratamentos para as matrizes foram comparadas utilizando o teste F, enquanto as médias dos tratamentos para os frangos de corte foram comparadas utilizando o teste de Student-Newman-Keuls. Essas análises foram realizadas com o procedimento GLM. Para dados que não apresentaram distribuição normal (discondroplasia tibial), foram aplicados testes não paramétricos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SAS, com nível de significância de 5% (SAS, 2014).

RESULTADOS

Desempenho

O desempenho não mostrou interação ($P > 0,05$) entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes e frangos de corte. No entanto, matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G resultaram em frangos de corte mais pesados ($P < 0,033$) no primeiro dia de idade (Tabela 3). Além disso, aos 21 e 42 dias de idade, os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram menor conversão alimentar ($P < 0,027$ e $P < 0,008$, respectivamente). Em relação ao efeito da inclusão de 1,25(OH)₂D₃-G no

crescimento dos frangos de corte, a suplementação de 50 mg/kg resultou em menor consumo de ração aos 42 dias de idade.

Tabela 3. Desempenho de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G (mg/kg)	1 a 21 dias				42 dias		
	PIM (g)	CRM (g)	GPM (g)	CA (g/g)	CRM (g)	GPM (g)	CA (g)
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes							
0,0	39,50 ^b	1080	826	1,321 ^b	4327	2884	1,505 ^b
100	39,73 ^a	1093	843	1,297 ^a	4323	2925	1,480 ^a
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos							
0,0	39,59	1092	831	1,314	4361 ^A	2904	1,507
50	39,61	1077	833	1,302	4282 ^B	2891	1,492
100	39,63	1091	841	1,310	4334 ^{AB}	2918	1,480
EPM	0,35	41,29	31,15	0,04	79,89	78,03	0,03
<i>P</i> valor							
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,033	0,309	0,117	0,027	0,749	0,067	0,008
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,942	0,536	0,440	0,735	0,024	0,573	0,552
Matrizes x Frangos - Interação	0,949	0,849	0,969	0,225	0,227	0,248	0,654

Nota: 1,25(OH)₂D₃-G: 1,25-dihidroxicolecalciferol Glicosídeo; PIM: Peso inicial médio; CRM Consumo de ração médio; GPM: Ganho de peso médio; CA: Conversão alimentar; EPM: Erro padrão da média; Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Rendimento de carcaça e cortes

O rendimento de carcaça exibiu uma interação ($P < 0,021$) entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes e frangos de corte (Tabela 4). A suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes e frangos de corte resultou em maior rendimento de carcaça ($P < 0,001$) nos frangos de corte aos 42 dias de idade (Figura 1).

Tabela 4. Rendimento de carcaça, cortes e peso relativo dos órgãos de frangos de corte abatidos aos 42 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G (mg/kg)	RC (%)	RP (%)	RP (%)	FP (%)	RA (%)	PRG (%)	PRF (%)
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes							
0,0	70,12 ^b	31,95	27,45	5,44	9,21	1,11	2,14
100	70,70 ^a	32,06	27,50	5,43	9,28	1,04	2,14
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos							
0,0	70,47	31,95	27,60	5,49	9,39	1,09	2,10

50	70,53	31,95	27,44	5,36	9,24	1,09	2,17
100	70,72	32,12	27,39	5,44	9,10	1,04	2,15
EPM	1,36	1,15	1,48	0,40	0,76	0,24	0,24
<i>P</i> valor							
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,013	0,588	0,857	0,880	0,576	0,079	0,914
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,901	0,714	0,775	0,257	0,168	0,524	0,330
Matrizes x Frangos - Interação	0,021	0,863	0,290	0,859	0,835	0,094	0,655

Nota: 1,25(OH)₂D₃-G: 1,25-dihidroxicolecalciferol Glicosídeo; RC: Rendimento de carcaça; RP: Rendimento de pernas (coxa e sobrecoxa); BY: Rendimento de peito; FP: Filé de peito (sassami); RA: Rendimento de asas; PGA: Peso relativo de gordura abdominal; PRF: Peso relativo do fígado; EPM: Erro padrão da média; Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

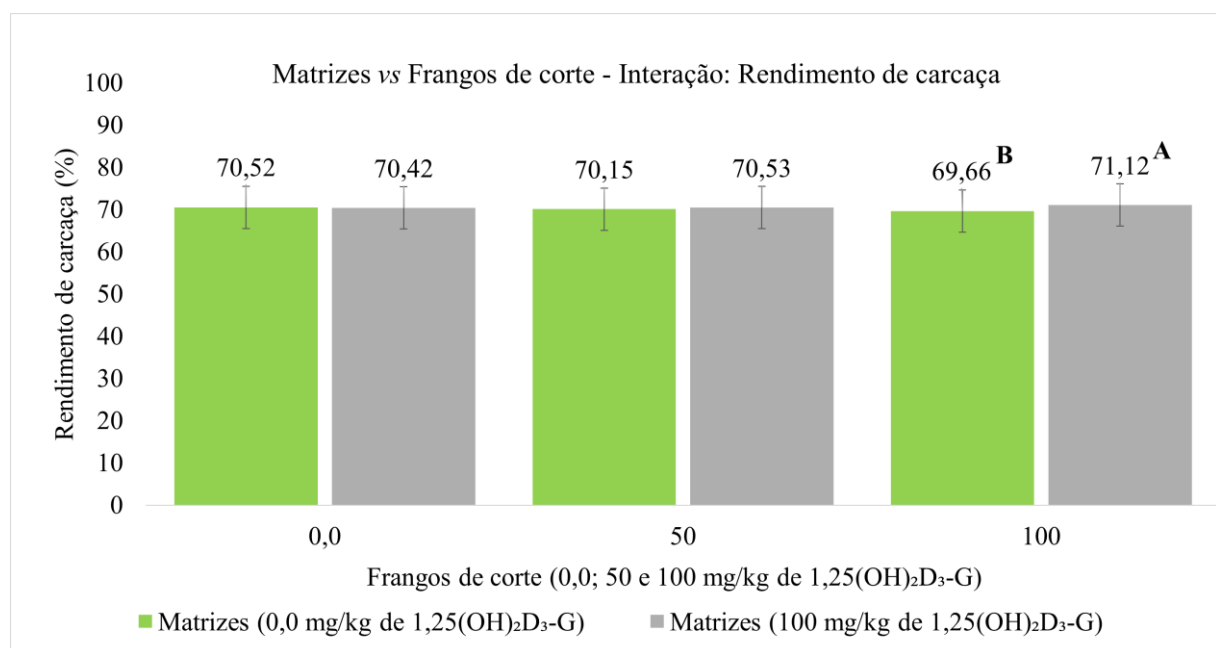


Figura 1. Análise da interação entre a suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na carcaça dos frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 5%. ^{AB}: Comparações entre frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo (P<0,001).

Histomorfometria intestinal

A histomorfometria intestinal no jejuno em frangos de corte aos 21 dias de idade não mostrou interação com a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes e frangos de corte (P>0,05). No entanto, os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram menor profundidade de criptas (P<0,001) e maior relação vilos:cripta (P<0,024) no jejuno aos 21 dias de idade (Tabela 5).

Tabela 5. Histomorfometria do jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	AV (μm)	PC (μm)	AA (μm ²)	V:C (μm)
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes				
0,0	945,46	132,17 ^a	19,22	7,24 ^b
100	917,17	111,26 ^b	17,64	8,14 ^a
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos				
0,0	913,56	130,25	20,17	7,15
50	968,06	119,69	17,43	8,14
100	912,31	115,25	17,70	7,82
EPM	167,48	17,71	3,75	1,35
P valor				
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,561	0,001	0,150	0,024
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,565	0,059	0,086	0,114
Matrizes x Frangos - Interação	0,382	0,179	0,938	0,686

Nota: 1,25(OH)₂D₃-G: 1,25-dihidroxicolecalciferol Glicosídeo; AV: Altura das vilosidades; PC: Profundidade das criptas; AA: Área de absorção; V:C: Relação vilo:cripta; EPM: Erro padrão da média; Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G versus frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Resistência a quebra da tíbia e sua composição

A resistência a quebra da tíbia foi menor nos frangos de corte aos 42 dias de idade, quando provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 6). A concentração de cálcio (P<0,032) na tíbia aos 21 dias e a concentração de fósforo (P<0,007) aos 42 dias mostraram uma interação significativa entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes e frangos de corte (Tabela 7). A suplementação (0, 50 e 100 mg/kg) de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G não aumentou a deposição de cálcio na tíbia aos 21 dias de idade (Figura 2). As concentrações mais altas de cálcio (P<0,032) foram observadas em frangos de corte que não receberam suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G e foram provenientes de matrizes não suplementadas (P<0,027). Além disso, uma maior concentração de fósforo (Figura 3) foi observada na tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade quando receberam suplementação (0 e 50 mg/kg) de 1,25(OH)₂D₃-G e eram provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G (P<0,001).

Tabela 6. Resistência à fratura da tíbia, expressa em matéria seca, de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G (mg/kg)	Resistência à fratura (kgf)	
	21 dias	42 dias

1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes		
0,0	17,78	42,25 ^a
100	17,76	39,49 ^b
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos		
0,0	17,69	39,62
50	17,60	41,69
100	18,00	41,30
EPM	2,93	4,44
<i>P</i> valor		
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,994	0,037
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,923	0,381
Matrizes x Frangos - Interação	0,152	0,746

Nota: 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo. EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg do mesmo composto; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Tabela 7. Composição bromatológica da tíbia, expressa em matéria seca, de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G levels (mg/kg)	21 dias		42 dias	
	P (%)	Ca (%)	P (%)	Ca (%)
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes				
0,0	8,05	16,36 ^a	5,73 ^b	15,63
100	8,14	15,47 ^b	6,19 ^a	16,04
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos				
0,0	8,34	16,28	6,24	16,19
50	8,10	15,81	5,88	15,71
100	7,84	15,65	5,75	15,62
EPM	0,61	1,46	0,57	1,14
<i>P</i> valor				
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,607	0,032	0,007	0,231
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,086	0,371	0,053	0,329
Matrizes x Frangos - Interação	0,083	0,027	0,001	0,566

Nota: 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo. P: Fósforo; Ca: Cálcio; SEM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos – interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg do mesmo composto; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

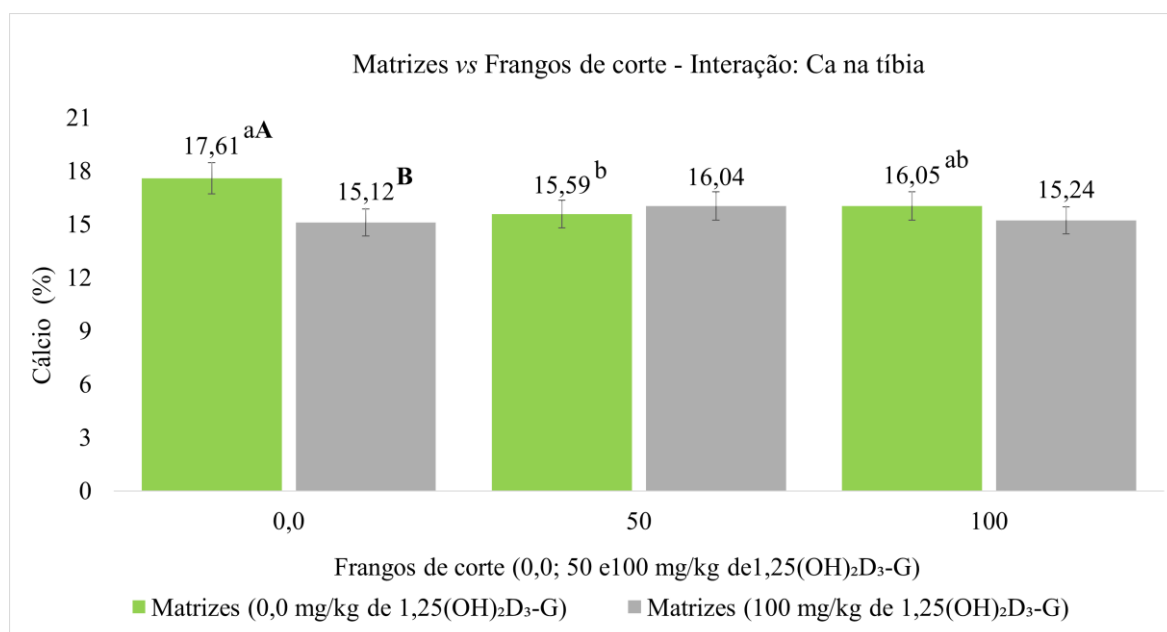


Figura 2. Análise da interação entre a suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na concentração de cálcio na tíbia dos frangos de corte aos 21 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5%. ^{ab}: Os frangos de corte suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com 100 mg/kg do aditivo (P<0,036). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 5%. ^{AB}: Comparações entre frangos de corte não suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo (P<0,001).

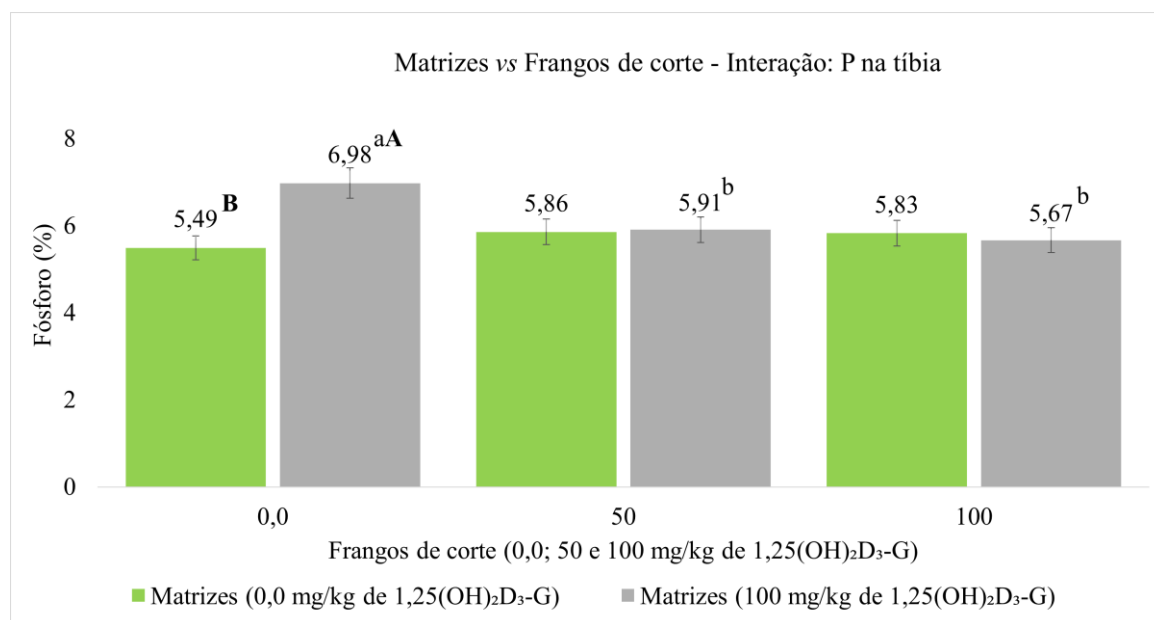


Figura 3. Análise da interação entre a suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte, e seu impacto na concentração do fósforo na tíbia dos frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5%. ^{ab}: Os frangos de corte suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo (P<0,001). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 5%. ^{AB}: Comparações entre frangos de corte não suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo (P<0,001).

Discondroplasia tibial

Os frangos de corte aos 42 dias de idade não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) nos resultados das lesões de discondroplasia tibial (Tabela 8).

Tabela 8. Discondroplasia tibial em frangos de corte aos 42 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G (mg/kg)	Grau das lesões tibiais				
	Escore médio	Isento (%)	leve (%)	Moderado (%)	Severo (%)
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes					
0,0	0,84	50,72	28,99	5,80	14,49
100	0,93	47,14	27,14	11,43	14,29
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos					
0,0	1,00	44,44	28,89	8,89	17,78
50	0,78	54,35	28,26	2,17	15,22
100	0,88	47,92	27,08	14,58	10,42
EPM	0,54				
<i>P</i> valor					
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,605	0,672	0,809	0,237	0,972
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,584	0,630	0,980	0,100	0,588
Matrizes x Frangos - Interação	0,506	-	-	-	-

Nota: 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo. EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg do mesmo composto; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Expressão gênica

A expressão gênica de calbindina D28K no jejuno dos frangos de corte aos 21 dias de idade não apresentou interação significativa entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes e dos frangos de corte (Tabela 9). No entanto, frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram níveis mais elevados de calbindina D28K ($P<0,019$) em comparação com aqueles provenientes de matrizes que não receberam a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G.

A expressão gênica de interleucina 10 e interleucina 1 β mostrou uma interação entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes e dos frangos de corte. A suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes ($P<0,046$) e dos frangos de corte ($P<0,054$) reduziu a expressão gênica de interleucina 10 no jejuno dos frangos de corte aos 21 dias de idade (Figura 4). A interleucina 1 β foi mais alta ($P<0,071$) nos frangos de corte suplementados com 50 mg/kg e quando provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G na dieta (Figura 5).

Tabela 9. Expressão gênica no jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

1,25(OH) ₂ D ₃ -G (mg/kg)	Calbindina D28K	Interleucina 10	Interleucina 1β
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes			
0,0	0,184 ^b	1,071	0,560
100	0,293 ^a	0,923	0,650
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos			
0,0	0,214	0,895	0,486
50	0,210	0,960	0,645
100	0,291	1,147	0,688
EPM	0,160	0,55	0,28
<i>P</i> valor			
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Matrizes	0,019	0,405	0,372
1,25(OH) ₂ D ₃ -G em Frangos	0,262	0,613	0,183
Matrizes x Frangos - Interação	0,383	0,046	0,022

Nota: 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo; EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - Interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg do mesmo composto; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

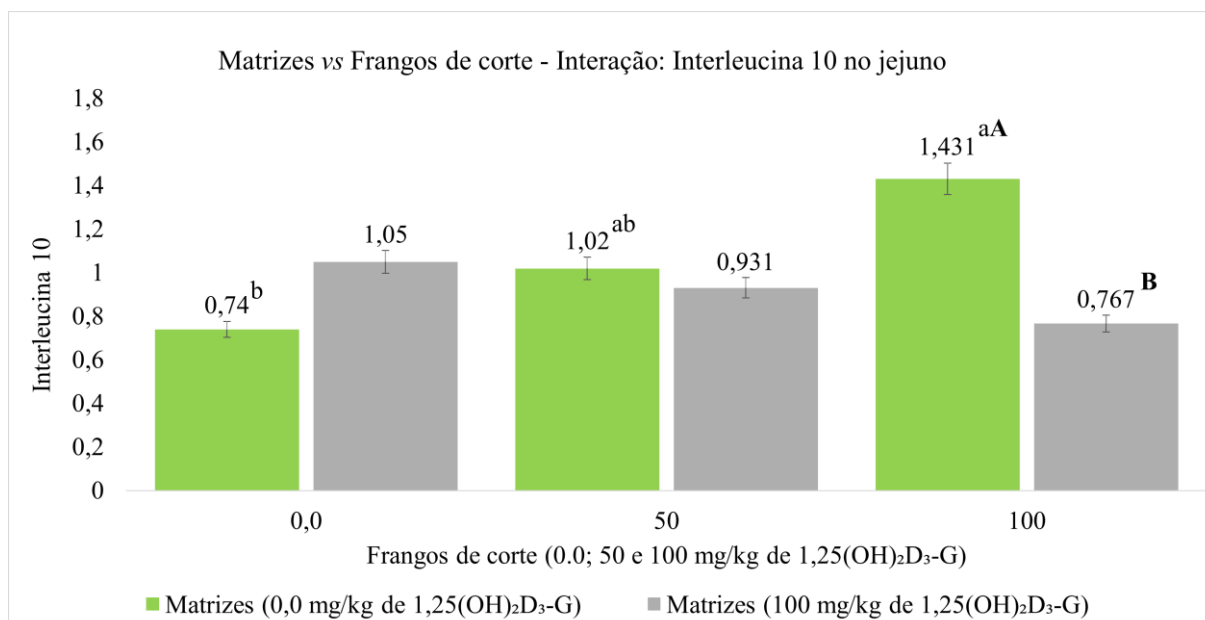


Figura 4. Análise da interação entre a suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na expressão gênica da interleucina 10 no jejuno dos frangos de corte aos 21 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5%. ^{ab}: Frangos de corte suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com o mesmo aditivo (P<0,049). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 5%. ^{AB}: Comparações entre frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo (P<0,052).

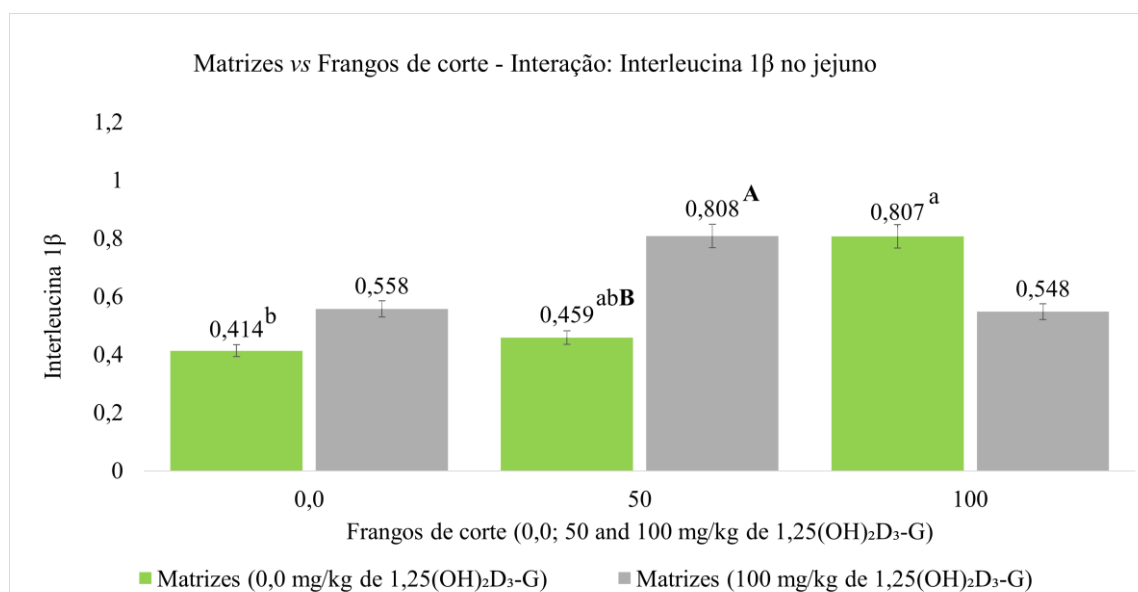


Figura 5. Análise da interação entre a suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na expressão gênica da interleucina 1β no jejuno dos frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5%. Os frangos de corte suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com 100 mg/kg do aditivo (P<0,031). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 5%. ^{AB}: Comparações entre frangos de corte suplementados com 50 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo (P<0,041).

DISCUSSÃO

As matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G produziram frangos de corte mais pesados ao nascimento. Isso provavelmente ocorreu porque o 1,25(OH)₂D₃-G, a forma ativa da vitamina D₃, estimulou a produção de proteínas que facilitaram o transporte de minerais do lúmen intestinal para a corrente sanguínea (Wang et al., 2021; Shojadoost et al., 2021; Fatemi et al., 2020, 2024; Li et al., 2023). Como resultado, houve uma maior concentração de cálcio e fósforo nos corpos das matrizes (Araujo et al., 2019; Setiyaningsih et al., 2023). Esses minerais foram essenciais para o desenvolvimento ósseo, tanto nas matrizes quanto no embrião, além de contribuírem para a mineralização do ovo (Barnkob et al., 2020; Li et al., 2021). Durante a formação do ovo, os minerais foram transferidos das matrizes para o ovo através da gema e da casca (Wen et al., 2019; Kanaani et al., 2022). O cálcio, por exemplo, foi incorporado à casca do ovo, enquanto o fósforo foi distribuído na gema, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento do sistema esquelético dos pintos (Li et al., 2023; Yusuf et al., 2023). Quando o ovo foi posto, esses nutrientes estavam disponíveis para o embrião em desenvolvimento (Fatemi et al., 2021, 2022). À medida que o embrião se desenvolvia, utilizava o cálcio e o fósforo para formar seus ossos, o que impactou diretamente o peso ósseo no momento da eclosão (Shojadoost et al., 2021; Li et al., 2023).

A menor conversão alimentar observada aos 21 e 42 dias nos frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G sugere um uso mais eficiente dos nutrientes (Hsiao et al., 2018; Aye-Cho et al., 2020). Isso pode ser atribuído à modulação do metabolismo intestinal, que melhorou a absorção de nutrientes essenciais sem a necessidade de maior consumo de ração (Wu et al., 2022). Resultados semelhantes foram observados no estudo de Mathis et al. (2016), no qual a inclusão de até 1 g/kg de ração melhorou o índice de conversão alimentar, indicando que o 1,25(OH)₂D₃-G pode ser uma alternativa viável nas dietas de frangos de corte sem comprometer a eficiência alimentar (Han et al., 2022).

O aumento no rendimento de carcaça observado aos 42 dias nos frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G pode estar relacionado a uma melhor utilização dos nutrientes desde os primeiros dias de vida (Fatemi et al., 2020). A suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta dos frangos de corte até 21 dias contribuiu para a modulação de processos fisiológicos, promovendo o crescimento muscular e a deposição de massa magra (Figura 1), o que resultou em um aumento no rendimento de carcaça aos 42 dias de idade.

Ao contrário de outros estudos que não observaram efeito significativo da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G no rendimento de carcaça, esses estudos atribuíram seus resultados ao equilíbrio adequado dos níveis de cálcio e fósforo na dieta (Vieites et al., 2014; Alves et al., 2018; Castro et al., 2018). No entanto, no presente estudo, mesmo com níveis normais desses minerais, a suplementação levou a um maior rendimento de carcaça. Isso sugere que o efeito observado pode estar relacionado a mecanismos adicionais de regulação metabólica, possivelmente envolvendo a modulação da absorção e utilização de nutrientes (Świątkiewicz et al., 2017; Shojadoost et al., 2021).

Os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram redução na profundidade das criptas e aumento na relação vilosidade:cripta no jejuno aos 21 dias de idade. A diminuição da profundidade das criptas pode ser interpretada como uma adaptação na estrutura intestinal, sugerindo uma menor necessidade de renovação celular, o que implica em maior eficiência energética (Badri et al., 2023; Wei et al., 2024). Isso provavelmente reflete a modulação da atividade das células-tronco intestinais pelo 1,25(OH)₂D₃-G, levando a uma arquitetura intestinal mais eficiente, com menor gasto energético para a manutenção dos tecidos (Hsiao et al., 2018; Shojadoost et al., 2021).

Além disso, a maior relação vilo:cripta observada nos frangos de corte aos 21 dias indica uma função intestinal melhorada. Essa mudança morfológica, na qual vilosidades mais longas e criptas mais rasas estão presentes, favorece a absorção eficiente de nutrientes (Nong

et al., 2023; Gao et al., 2024). Embora não tenha sido observada alteração na altura das vilosidades ou na área de absorção, a alteração na relação vilo:cripta sugere uma adaptação estrutural que otimiza a captação de nutrientes (Babazadeh et al., 2022; Shojadoost et al., 2021).

No entanto, é importante notar que não foram observadas melhorias significativas na saúde óssea dos frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade (Tabelas 7 e 8). Os frangos de corte suplementados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, mesmo quando provenientes de matrizes que receberam a mesma suplementação, não apresentaram maior mineralização óssea. Isso foi evidenciado pela menor concentração de cálcio na tíbia aos 21 dias (Figura 2) e ossos mais fracos aos 42 dias. Resultados semelhantes foram relatados por Vieites et al. (2016), que avaliaram a inclusão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de frangos de corte aos 21 dias de idade e não encontraram melhorias na mineralização ou resistência óssea.

Curiosamente, frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ apresentaram níveis mais elevados de calbindina D28K no jejuno aos 21 dias de idade, sugerindo uma maior absorção intestinal de cálcio. No entanto, isso não resultou em maior deposição de cálcio nos ossos, o que pode ter limitado a mineralização e, consequentemente, reduzido a resistência da tíbia a fraturas. Uma possível explicação para esses resultados é a regulação complexa da mineralização óssea, que depende não apenas da disponibilidade de minerais, mas também de fatores como a síntese da matriz óssea, a atividade de osteoblastos e osteoclastos, e interações com outros nutrientes essenciais (Li et al., 2016; Tizziani et al., 2019; Lv et al., 2022; Han et al., 2024).

Os níveis mais elevados de interleucina 10 e interleucina 1β em frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, quando provenientes de matrizes não suplementadas (Figuras 4 e 5), indicam que o efeito imune observado está diretamente relacionado à suplementação contínua durante o crescimento, e não ao aporte nutricional proporcionado pelas matrizes (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Kumar et al., 2017; Ismailova & White, 2022). Enquanto a suplementação das matrizes contribuiu para a mineralização óssea dos frangos, não parece ter desempenhado um papel significativo na modulação imunológica (Araujo et al., 2019; Setiyaningsih et al., 2023).

A suplementação direta com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nos frangos de corte durante o crescimento influenciou a regulação imunológica, especialmente pelo aumento na produção de interleucina 10 (Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020). Essa citocina anti-inflamatória desempenha um papel crucial na modulação do sistema imunológico, atuando como reguladora da resposta inflamatória mediada pela interleucina 1β , uma citocina pró-inflamatória associada à ativação do sistema imune inato (Nunes et al., 2020; Abascal-Ponciano et al., 2022). O aumento da

interleucina 10 pode ter controlado a intensidade da resposta inflamatória induzida pelo incremento da interleucina 1 β , prevenindo efeitos adversos associados à inflamação excessiva, ao mesmo tempo que manteve uma defesa imune eficaz (Nunes et al., 2020; Shojadoost et al., 2021; Kumar et al., 2023).

Nos frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G, o estado imune basal pode ter sido menos responsivo à suplementação contínua durante o crescimento, devido a uma menor necessidade de compensação imunológica (Nunes et al., 2020; Chou et al., 2021; Wu et al., 2022). Em contraste, nos frangos de matrizes não suplementadas, o sistema imune provavelmente se encontrava em um estado inicial menos desenvolvido, tornando a suplementação durante o crescimento essencial para promover a produção equilibrada de citocinas, como interleucina 10 e interleucina 1 β (Nunes et al., 2020; Shojadoost et al., 2021; Nong et al., 2023).

CONCLUSÃO

A suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G na dieta de matrizes é eficaz para garantir frangos de corte mais pesados ao nascimento, com menor conversão alimentar aos 21 e 42 dias e maior rendimento de carcaça aos 42 dias. No entanto, a suplementação de 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G na dieta dos frangos de corte é insuficiente para melhorar a saúde intestinal e a integridade da tíbia. Por outro lado, frangos de corte provenientes de matrizes não suplementadas, quando suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G, apresentaram melhor resposta imune aos 21 dias em comparação com aqueles provenientes de matrizes suplementadas.

REFERÊNCIAS

- Abascal-Ponciano, G. A., Leiva, S. F., Flees, J. J., Avila, L. P., Starkey, J. D., & Starkey, C. W. (2022). Dietary 25-Hydroxyvitamin D $_3$ Supplementation Modulates Intestinal Cytokines in Young Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.947276>
- Adhikari, R., White, D., House, J. D., & Kim, W. K. (2020). Effects of additional dosage of vitamin D $_3$, vitamin D $_2$, and 25-hydroxyvitamin D $_3$ on calcium and phosphorus utilization, egg quality and bone mineralization in laying hens. *Poultry Science*, 99(1), 364–373. <https://doi.org/10.3382/ps/pez502>
- Alves, O. dos S., Calixto, L. F. L., Araujo, A. H. B., Torres-Cordido, K. A. A., Reis, T. L., & Calderano, A. A. (2018). Decreased levels of vitamin D $_3$ and supplementation with 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ -glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broiler chickens. *Ciência Rural*, 48(8). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170705>
- Araujo, L. F., Araujo, C. S. S., Pereira, R. J. G., Bittencourt, L. C., Silva, C. C., Cisneros, F., Hermes, R. G., Sartore, Y. G. A., & Dias, M. T. (2019). The dietary supplementation of canthaxanthin in combination with 25OHD $_3$ results in reproductive, performance, and progeny quality gains in broiler breeders. *Poultry Science*, 98(11), 5801–5808. <https://doi.org/10.3382/ps/pez377>
- Asnayanti, A., Alharbi, K., Do, A. D. T., Al-Mitib, L., Bühler, K., Van der Klis, J. D., Gonzalez, J., Kidd, M. T., & Alrubaye, A. A. K. (2024). Early 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ -glycosides supplementation: an efficient feeding strategy against bacterial chondronecrosis with osteomyelitis lameness in broiler chickens assessed

- by using an aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research*, 33(3), 100440. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100440>
- Aye-Cho, T.-Z., Sadiq, M. B., Srichana, P., & Anal, A. K. (2020). Vitamin D₃ enhanced intestinal phosphate cotransporter genes in young and growing broiler chickens. *Poultry Science*, 99(4), 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.038>
- Babazadeh, D., Razavi, S. A., Abd El-Ghany, W. A., & F Cotter, P. (2022). Vitamin D Deficiency in Farm Animals: A Review. *Farm Animal Health and Nutrition*, 1(1), 10–16. <https://doi.org/10.58803/fahn.v1i1.7>
- Badri, F., El-Wardany, I., Anwar, H., Ghonime, M., & Ali, R. (2023). In ovo injection of vitamin D₃ to promote post-hatch performance, intestine histomorphology, bone characteristics, and blood constituents of broiler chickens. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 26(3), 365–374. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2023.332914>
- Barnkob, L. L., Argyraki, A., & Jakobsen, J. (2020). Naturally enhanced eggs as a source of vitamin D: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.018>
- Castro, F. L. de S., Baião, N. C., Ecco, R., Louzada, M. J. Q., Melo, É. de F., Saldanha, M. M., Triginelli, M. V., & Lara, L. J. C. (2018). Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D₃ level on broiler performance and bone quality. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47(0). <https://doi.org/10.1590/rbz4720170186>
- Chou, P.-C., Lin, P.-C., Wu, S.-W., Wang, C.-K., Chung, T.-K., Walzem, R. L., Lai, L.-S., & Chen, S.-E. (2021). Differential Modulation of 25-hydroxycholecalciferol on Innate Immunity of Broiler Breeder Hens. *Animals*, 11(6), 1742. <https://doi.org/10.3390/ani11061742>
- Edwards, H. M. (1989). The Effect of Dietary Cholecalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on the Development of Tibial Dyschondroplasia in Broiler Chickens in the Absence and Presence of Disulfiram. *Journal of Nutrition* 119:647–652.
- Fatemi, S. A., Elliott, K. E. C., Bello, A., Durojaye, O. A., Zhang, H.-J., & Peebles, E. D. (2020). The effects of in ovo injected vitamin D₃ sources on the eggshell temperature and early posthatch performance of Ross 708 broiler chickens. *Poultry Science*, 99(3), 1357–1362. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.055>
- Fatemi, S. A., Elliott, K. E. C., Bello, A., & Peebles, E. D. (2021). Effects of the in ovo injection of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in Ross 708 broiler chickens subsequently challenged with coccidiosis. I. performance, meat yield and intestinal lesion incidence^{1,2,3}. *Poultry Science*, 100(10), 101382. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101382>
- Fatemi, S. A., Elliott, K. E. C., Macklin, K. S., Bello, A., & Peebles, E. D. (2022). Effects of the In Ovo Injection of Vitamin D₃ and 25-Hydroxyvitamin D₃ in Ross 708 Broiler chickens Subsequently Challenged with Coccidiosis: II Immunological and Inflammatory Responses and Small Intestine Histomorphology. *Animals*, 12(8), 1027. <https://doi.org/10.3390/ani12081027>
- Fatemi, S. A., Levy, A. W., & Peebles, E. D. (2024). Ross 708 broiler small intestine morphology and immunity improvements in response to in ovo Marek's Disease vaccine administration alone or in conjunction with in ovo and dietary supplemental calcifediol. *Poultry Science*, 103(10), 104098. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104098>
- Gao, H., Zhao, X., Guo, Y., Li, Z., & Zhou, Z. (2024). Coated sodium butyrate and vitamin D₃ supplementation improve gut health through influencing intestinal immunity, barrier, and microflora in early-stage broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(7), 4058–4069. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13288>
- Gil, Á., Plaza-Díaz, J., & Mesa, M. D. (2018). Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(2), 87–95. <https://doi.org/10.1159/000486536>
- Gili, V., Pardo, V. G., Ronda, A. C., De Genaro, P., Bachmann, H., Boland, R., & de Boland, A. R. (2016). In vitro effects of 1 α ,25(OH)₂D₃-glycosides from Solbone A (*Solanum glaucophyllum* leaves extract; Herbonis AG) compared to synthetic 1 α ,25(OH)₂D₃ on myogenesis. *Steroids*, 109, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.03.002>
- Han, J., Wu, L., Lv, X., Liu, M., Zhang, Y., He, L., Hao, J., Xi, L., Qu, H., Shi, C., Li, Z., Wang, Z., Tang, F., & Qiao, Y. (2022). Intestinal segment and vitamin D₃ concentration affect gene expression levels of calcium and phosphorus transporters in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Technology*. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e78>
- Han, J., Lv, X., He, L., Liu, M., Qu, H., Xi, L., Zhang, L., Ma, B., Shi, C., Yang, G., & Wang, Z. (2024). MAPK signaling pathway participates in the regulation of intestinal phosphorus and calcium absorption in broiler chickens via 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Poultry Science*, 103(10), 104052. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104052>
- Hsiao, F. S.-H., Cheng, Y.-H., Han, J.-C., Chang, M.-H., & Yu, Y.-H. (2018). Effect of different vitamin D₃ metabolites on intestinal calcium homeostasis-related gene expression in broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47(0). <https://doi.org/10.1590/rbz4720170015>
- Hurst, E. A., Homer, N. Z., & Mellanby, R. J. (2020). Vitamin D Metabolism and Profiling in Veterinary Species. *Metabolites*, 10(9), 371. <https://doi.org/10.3390/metabo10090371>

- Ismailova, A., & White, J. H. (2022). Vitamin D, infections and immunity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 23(2), 265–277. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09679-5>
- Kanaani, R., Kianfar, R., Janmohammadi, H., W. Olyae, M. (2022). Influence of vitamin D₃ and lactic acid on performance, egg quality, and hatchability in broiler breeder hens. *Animal Production Research*, 11, 67–81. <https://doi.org/10.22124/ar.2022.21551.1683>
- Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2002). A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and Experimental Medicine*, 2(3), 131–135. <https://doi.org/10.1007/s102380200018>
- Kumar, R., Brar, R. S., & Banga, H. S. (2017). Hypervitaminosis D₃ in broiler chicks: histopathological, immunomodulatory and immunohistochemical approach. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(3), 170–176.
- Kumar, R., Singh Banga, H., & Singh Brar, R. (2023). Effects of Dietary Vitamin D₃ Over-Supplementation on Broiler Chickens' Health; Clinicopathological and Immunohistochemical Characteristics. *Journal of Veterinary Physiology and Pathology*, 2(2), 20–31. <https://doi.org/10.58803/jvpp.v2i2.21>
- Li, J., Yuan, J., Miao, Z., & Guo, Y. (2016). Effects of age on intestinal phosphate transport and biochemical values of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(2), 221–228. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0540>
- Li, D., Zhang, K., Bai, S., Wang, J., Zeng, Q., Peng, H., Su, Z., Xuan, Y., Qi, S., & Ding, X. (2021). Effect of 25-Hydroxycholecalciferol with Different Vitamin D₃ Levels in the Hens Diet in the Rearing Period on Growth Performance, Bone Quality, Egg Production, and Eggshell Quality. *Agriculture*, 11(8), 698. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080698>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luna, L. G. (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Pathology* (Vol. 3).
- Lv, X., Hao, J., Wu, L., Liu, M., He, L., Qiao, Y., Cui, Y., Wang, G., Zhang, C., Qu, H., & Han, J. (2022). Age quadratically affects intestinal calcium and phosphorus transporter gene expression in broiler chickens. *Animal Bioscience*, 35(12), 1921–1928. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0058>
- Mathis, G., Boland, R., Bachmann, H., Toggenburger, A., & Rambeck, W. (2016). Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of herbal origin in broiler chicken. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 158(12), 819–826. <https://doi.org/10.17236/sat00097>
- Nong, K., Liu, Y., Fang, X., Qin, X., Liu, Z., & Zhang, H. (2023). Effects of the Vitamin D₃ on Alleviating the Oxidative Stress Induced by Diquat in Wenchang Chickens. *Animals*, 13(4), 711. <https://doi.org/10.3390/ani13040711>
- Nunes, R. A., Duarte, M. de S., Campos, P. H. R. F., de Oliveira, L. L., e Silva, F. F., Kreuz, B. S., Mirabile, C. G., Borges, S. O., & Calderano, A. A. (2020). Active vitamin D₃-glycoside preserves weight gain and modulates the inflammatory response in broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Animal Feed Science and Technology*, 270, 114704. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114704>
- Ospina-Rojas, I. C., Murakami, A. E., Duarte, C. R. A., Sakamoto, M. I., Aguihe, P. C., Pozza, P. C., & Santos, T. C. (2018). Tibiotarsus bone characteristics and tibial dyschondroplasia incidence of broiler chickens fed diets supplemented with leucine and valine. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2). <https://doi.org/10.1111/jpn.12832>
- Proszkowiec-Weglarz, M., Schreier, L. L., Miska, K. B., Angel, R., Kahl, S., & Russell, B. (2019). Effect of early neonatal development and delayed feeding post-hatch on jejunal and ileal calcium and phosphorus transporter genes expression in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(4), 1861–1871. <https://doi.org/10.3382/ps/pey546>
- Rodriguez-Lecompte, J. C., Yitbarek, A., Cuperus, T., Echeverry, H., & van Dijk, A. (2016). The immunomodulatory effect of vitamin D in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels. *Poultry Science*, 95(11), 2547–2556. <https://doi.org/10.3382/ps/pew186>
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M. I., Donzele, J. L., Sakomura, N. K., Perazzo, F. G.; Saraiva, A., Teixeira, M. L., Rodrigues, P. B., Oliveira, R. F., Barreto, S. L. T., Brito, C. O. (2017). Tabelas brasileiras de aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais 4: 448.
- Sakomura, N. K., & Rostagno, S. H. (2016). Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos (FUNEP, Ed.; Vol. 2).
- San, J., Zhang, Z., Bu, S., Zhang, M., Hu, J., Yang, J., & Wu, G. (2021). Changes in duodenal and nephritic Ca and P absorption in hens during different egg-laying periods. *Heliyon*, 7(1), e06081. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06081>
- SAS Institute. (2014). SAS University Edition: Installation Guide for Windows. SAS Institute Inc. Retrieved April 20, 2024, from

<https://support.sas.com/documentation/installcenter/en/ueclientswn/67533/PDF/default/sasuniversityedition.pdf>

- Setiyaningsih, N., Jayanegara, A., & Wardani, W. W. (2023). Effects of a Vitamins D and C Supplement on Performance, Hatchability and Blood Profiles of Broiler Breeders. *Journal of World's Poultry Research*. <https://doi.org/10.36380/jwpr.2023.7>
- Shojadoost, B., Yitbarek, A., Alizadeh, M., Kulkarni, R. R., Astill, J., Boodhoo, N., & Sharif, S. (2021). Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. *Poultry Science*, 100(4), 100930. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.027>
- Silva, D. J., & Queiroz, A. C. (2009). *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos* (3rd ed), Impresiana. Universitária da UFV, Viçosa, 235 p.
- Souza, C. S., Vieites, F. M., Nunes, R. V., Brusamarello, E., Reis, T. L., Lima, C. A. R. de, & Vargas Junior, J. G. de. (2020). Suplemento de 1,25-dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte fêmeas. *Research, Society and Development*, 9(7), e119973975. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3975>
- Świątkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., Bederska-Lojewska, D., & Józefiak, D. (2017). Efficacy of dietary vitamin D and its metabolites in poultry - review and implications of the recent studies. *World's Poultry Science Journal*, 73(1), 57–68. <https://doi.org/10.1017/S0043933916001057>
- Tizziani, T., Donzele, R. F. M. de O., Donzele, J. L., Silva, A. D., Muniz, J. C. L., Jacob, R. de F., Brumano, G., & Albino, L. F. T. (2019). Reduction of calcium levels in rations supplemented with vitamin D₃ or 25-OH-D₃ for broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48. <https://doi.org/10.1590/rbz4820180253>
- Trautenmüller, H., Genova, J. L., Faria, A. B. B. de, Martins, J. S., Viana, S. C. M., Castilha, L. D., Gonçalves, A. C., Baraldi-Artori, S. M., & Carvalho, P. L. de O. (2021). Bone traits and gastrointestinal tract parameters of piglets fed cholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 50. <https://doi.org/10.37496/rbz5020210098>
- Trautenmüller, H., Genova, J. L., Santos, L. B. de A. dos, Leal, I. F., Santos, G. de B., Rupolo, P. E., Nunes, R. V., Oliveira, E. R. de, & Carvalho, P. L. de O. (2022). Partial cholecalciferol replacement with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside in diets for piglets. *Animal Production Science*, 62(16), 1590–1599. <https://doi.org/10.1071/AN21150>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Vieites, F. M., Drosghic, L. C. A. B., Souza, C. S., Vargas Júnior, J. G., Nunes, R. V., Moraes, G. H. K. de, Corrêa, G. S. S., & Caramori Júnior, J. G. (2016). Características ósseas de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1), 381. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p381>
- Vieites, F. M., Drosghic, L. C. A. B., Souza, C. S., Lima, C. A. R., Moraes, G. H. K., Nunes, R. V., Vasconcellos, C. H. F., & Vargas Júnior, J. G. (2017). 1,25-dihidroxitamina-D₃ sobre as características ósseas de frangos de corte fêmeas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(5), 1285–1293. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9371>
- Vieites, F. M., Brusamarello, E., Corrêa, G. da S. S., Souza, C. S., De Oliveira, C. F. S., De Moraes, G. H. K., & Caramori Júnior, J. G. (2018). 1,25-dihidroxicolecalciferol de origem herbal (*Solanum glaucophyllum*) mantém o desempenho e a qualidade óssea de frangos de corte fêmeas durante restrição de cálcio e fósforo. *Archivos de Zootecnia*, 67(259), 414–419. <https://doi.org/10.21071/az.v67i259.3799>
- Wang, Y. B., Chen, F., Gou, Z. Y., Li, L., Lin, X. J., Zhang, S., & Jiang, S. Q. (2021). Requirement of Vitamin D₃ on fast-growing yellow-feathered breeder hens. *Scientia Agricultura Sinica*, 54(16), 3549–3560. <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2021.16.016>
- Wei, J., Li, L., Peng, Y., Luo, J., Chen, T., Xi, Q., Zhang, Y., & Sun, J. (2024). The Effects of Optimal Dietary Vitamin D₃ on Growth and Carcass Performance, Tibia Traits, Meat Quality, and Intestinal Morphology of Chinese Yellow-Feathered Broiler Chickens. *Animals*, 14(6), 920. <https://doi.org/10.3390/ani14060920>
- Wen, J., Livingston, K. A., & Persia, M. E. (2019). Effect of high concentrations of dietary vitamin D₃ on pullet and laying hen performance, skeleton health, eggshell quality, and yolk vitamin D₃ content when fed to W36 laying hens from day of hatch until 68 wk of age. *Poultry Science*, 98(12), 6713–6720. <https://doi.org/10.3382/ps/pez386>
- Wu, L., Wang, X., Lv, X., He, L., Qu, H., Shi, C., Zhang, L., Zhang, J., Wang, Z., & Han, J. (2022). 1,25-Dihydroxycholecalciferol Improved the Growth Performance and Upregulated the Calcium Transporter Gene Expression Levels in the Small Intestine of Broiler Chickens. *The Journal of Poultry Science*, 59(2), 0210019. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210019>
- Yavaş, İ., Çenesiz, A. A., & Ceylan, N. (2020). Effects of Herbal Vitamin D₃ and Phytase Supplementation to Broiler Feed on Performance, Bone Development and Serum Parameters of Broiler chickens. *Tarım Bilimleri Dergisi*. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.479182>

Matrizes com 46 semanas de idade suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G produzem pintos mais pesados ao nascimento, com melhor saúde óssea e imunidade aos 21 dias de idade

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) sobre o desempenho, histomorfometria intestinal, perfil bioquímico sanguíneo, saúde óssea e expressão gênica em frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G. Um total de 1.152 frangos machos Ross 308 AP de um dia de idade foram distribuídos em um delineamento fatorial inteiramente casualizado (2 × 3). Um fator foi a suplementação (0 ou 100 mg kg⁻¹) de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes de 21 a 46 semanas. O outro fator foi a suplementação (0, 50, 100 mg kg⁻¹) na dieta dos frangos de corte de 1 a 21 dias. O experimento consistiu em seis tratamentos, oito repetições e 24 aves por unidade experimental. A suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes gerou frangos de corte mais pesado ao nascimento e melhorou a saúde óssea aos 21 dias, com maior deposição de cálcio e fósforo e maior resistência da tíbia. Além disso, aumentou a expressão de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1β no jejuno. Os frangos suplementados com 50 mg kg⁻¹ apresentaram maior deposição de fósforo na tíbia, enquanto aqueles que receberam 50 ou 100 mg kg⁻¹ tiveram maiores níveis de interleucina 10 quando provenientes de matrizes suplementadas. Conclui-se que a suplementação de 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes favorece o maior peso ao nascimento dos frangos de corte e melhorou a saúde óssea e a resposta imune aos 21 dias de idade.

Palavras-chave: Calbindina, interleucina, aves, mineralização tibial, vitamina D₃

Breeders at 46 weeks of age supplemented with 1,25(OH)₂D₃-G produce heavier chicks at hatch, with improved bone health and immunity at 21 days of age

Abstract

This study evaluated the effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside (1,25(OH)₂D₃-G) on performance, intestinal histomorphometry, blood biochemical profile, bone health, and gene expression in broiler chickens from breeders that were either supplemented or not supplemented with 1,25(OH)₂D₃-G. A total of 1,152 one-day-old male Ross 308 AP broilers were assigned to a completely randomized factorial design (2 × 3). One factor was the supplementation (0 or 100 mg kg⁻¹) of 1,25(OH)₂D₃-G in breeder diets from 21 to 46 weeks of age. The second factor was the supplementation (0, 50, or 100 mg kg⁻¹) in broiler diets from day 1 to 21. The experiment consisted of six treatments, eight replicates, and 24 birds per experimental unit. Supplementation of 1,25(OH)₂D₃-G in breeders resulted in heavier broilers at hatch and improved bone health at 21 days, with greater calcium and phosphorus deposition

and increased tibial strength. It also enhanced the expression of calbindin D28K, interleukin-10, and interleukin-1 β in the jejunum. Broilers supplemented with 50 mg kg⁻¹ showed greater phosphorus deposition in the tibia, while those receiving 50 or 100 mg kg⁻¹ had higher interleukin-10 levels when derived from supplemented breeders. It is concluded that supplementation of 100 mg kg⁻¹ of 1,25(OH)₂D₃-G in breeder diets promotes greater hatch weight in broilers and improves bone health and immune response at 21 days of age.

Keywords: Calbindin, interleukin, poultry, tibial mineralization, vitamin D₃

INTRODUÇÃO

A avicultura desempenha um papel fundamental na economia global, destacando-se como uma das principais fontes de proteína animal consumidas mundialmente (Kanani et al., 2022; Nong et al., 2023). Com o aumento da demanda por carne, os produtores têm adotado estratégias eficazes para otimizar a produção e garantir o bem-estar das aves (Hsiao et al., 2018; Khan et al., 2023). Dentre essas abordagens, a suplementação com vitamina D₃ tem sido amplamente reconhecida por promover o crescimento saudável e a saúde óssea em aves (Adhikari et al., 2020; Barnkob et al., 2020; Babazadeh et al., 2022).

Essa vitamina é comumente fornecida em sua forma inativa, o colecalciferol (Hsiao et al., 2018; Shojadoost et al., 2021). Para exercer suas funções, o colecalciferol deve ser convertido em seu metabólito ativo, o 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃), por meio de processos no fígado e nos rins (Mathis et al., 2016; Anderson, 2017; Castro et al., 2018; Sakkas et al., 2019). Essa conversão é essencial para o metabolismo do cálcio e do fósforo, auxiliando na saúde óssea e no fortalecimento do sistema imune das aves (Shojadoost et al., 2021; Kumar et al., 2023). Além disso, outros metabólitos, como o 25-hidroxicolecalciferol e o 1 α -hidroxicolecalciferol, desempenham papéis complementares, ampliando os benefícios da vitamina D₃ na nutrição avícola (Sakkas et al., 2019; Wen et al., 2019; Setiyaningsih et al., 2023).

Dentre os metabólitos mencionados, o 1,25(OH)₂D₃ se destaca e pode ser extraído das folhas da planta *Solanum glaucophyllum* com uma ligação glicosídica, formando o 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2017, 2018). Nesse caso, esse metabólito da vitamina D₃ está ligado a uma molécula de açúcar por meio dessa ligação, que precisa ser quebrada no intestino delgado das aves para liberar o 1,25(OH)₂D₃ ativo (Nunes et al., 2020). Sendo solúvel em água, o 1,25(OH)₂D₃-G é facilmente absorvido pelo intestino, permitindo uma ação mais rápida em comparação a outros metabólitos lipossolúveis da vitamina D₃, que requerem a formação de micelas para absorção intestinal e precisam passar pelo fígado e pelos rins para ativação antes de exercerem sua função (Shao et al., 2019; Aye Cho et al., 2020; Lv et al., 2022).

Esse metabólito ativo (1,25(OH)₂D₃-G) é crucial para a regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo, facilitando a absorção intestinal desses minerais e sua adequada deposição nos ossos (Souza & Vieites, 2014; Vieites et al., 2017, 2018). Em sistemas de produção intensiva, nos quais as aves são

mantidas em ambientes confinados, com mobilidade reduzida e rápido ganho de peso, a pressão sobre o esqueleto aumenta, elevando os riscos de deformidades e lesões (Colet et al., 2015; Alves et al., 2018; Wei et al., 2024). Nesse contexto, a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ é essencial para fortalecer os ossos durante o crescimento, prevenir a perda de densidade óssea e garantir a integridade estrutural necessária para o bem-estar e o desenvolvimento das aves (Vieites et al., 2016; Shojadoost et al., 2021; Kumar et al., 2023).

Além disso, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ desempenha um papel fundamental na modulação da resposta imune das aves (Nunes et al., 2020). Estudos indicam que esse metabólito ativa diversas vias imunológicas, incluindo a indução de citocinas, como interleucina 10 e interleucina 1β , essenciais para o fortalecimento das defesas do organismo (Hsiao et al., 2018; Shojadoost et al., 2021). A interleucina 10 possui efeito anti-inflamatório, auxiliando na regulação da resposta imune e prevenindo danos teciduais, enquanto a interleucina 1β está envolvida na ativação da resposta inflamatória, crucial para a defesa contra patógenos (Nunes et al., 2020; Kumar et al., 2023).

Esse equilíbrio entre citocinas contribui para uma resposta imune mais eficiente e maior resistência a infecções (Nunes et al., 2020; Shojadoost et al., 2021). Esse efeito é particularmente relevante em ambientes de alta densidade, onde o risco de doenças infecciosas é maior (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Jaime et al., 2020). Ao fortalecer as defesas imunológicas, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ contribui para a manutenção da saúde geral das aves, promovendo maior resistência a patógenos e melhor adaptação às condições de produção (Nunes et al., 2020).

No entanto, estudos ressaltam a necessidade de mais pesquisas sobre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes e de sua progênie, visando avaliar seus efeitos no fortalecimento ósseo e na resposta imune dos frangos de corte ao nascimento e durante o crescimento (Chou et al., 2021; Kanani et al., 2022; Setiyaningsih et al., 2023). Além disso, ainda há divergências sobre a dose ideal de suplementação, pois níveis excessivos podem levar à toxicidade, causando problemas graves, como calcificação excessiva e danos ósseos, contribuindo para a falta de consenso sobre sua aplicação na avicultura (Vieites et al., 2017; Adhikari et al., 2020; Barnkob et al., 2020; Souza et al., 2020).

Dessa forma, este estudo partiu da hipótese de que matrizes suplementadas com esse metabólito produziram frangos de corte com ossos mais resistentes ao nascimento, além de melhor resposta imune ao longo do crescimento e maior mineralização óssea aos 21 dias de idade. Partindo desta hipótese, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ sobre o desempenho, histomorfometria intestinal, parâmetros bioquímicos sanguíneo, saúde óssea e expressão gênica em frangos de corte aos 21 dias de idade, provenientes de matrizes suplementadas ou não com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manejo e instalações

Dois galpões (G1 e G2) foram estabelecidos para alojar 8.000 matrizes AP95 (Aviagen) a partir de 21 semanas de idade. Os galpões eram idênticos em termos de características físicas, e as práticas de manejo foram padronizadas para ambos. Cada galpão media 175 m × 13 m, possuía estrutura metálica, cobertura de Brasilit e altura de 3 metros sem isolamento térmico. Foram equipados com telas de proteção e cortinas, além de ventiladores para manter a ventilação com pressão positiva. Os ninhos eram mecânicos, enquanto o sistema de alimentação consistia em comedouros automáticos, específicos para matrizes, e os bebedouros eram do modelo pendular.

As dietas fornecidas às matrizes nos galpões G1 e G2 eram idênticas, formuladas com milho e farelo de soja para atender às exigências nutricionais durante todo o período produtivo (21 a 46 semanas de idade). No entanto, as matrizes do galpão G1 receberam uma dieta farelada suplementada com 1,25(OH)₂D₃-G na dosagem de 100 mg kg⁻¹ a partir das 21 semanas de idade, enquanto as matrizes do galpão G2 receberam uma dieta farelada sem a suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G.

Aos apresentarem 46 semanas de idade, os ovos de cada galpão foram coletados separadamente, identificados, selecionados e higienizados. Em seguida, foram transportados para o incubatório e incubados em incubadoras *Jamesway Platinum Series*, onde permaneceram por 18 dias a 37,5°C e umidade relativa de 60%. Após esse período, os ovos foram transferidos para os nascedouros, onde permaneceram a 37,2°C e 65% de umidade relativa até a eclosão.

Após a eclosão, os pintos foram sexados e vacinados contra a doença de Marek, Bouda Aviária, Gumboro e Bronquite Infecciosa. Em seguida, foram devidamente identificados conforme a origem das matrizes, considerando a suplementação ou não de 1,25(OH)₂D₃-G, e posteriormente enviados ao Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon, Paraná - Brasil.

Um total de 1152 pintos de corte, machos, de um dia, da linhagem Ross 308 AP95, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 3. Um dos fatores considerou a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes (0,0 e 100 mg/kg) e o outro, três níveis (0,0; 50 e 100 mg/kg) de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas dos frangos de corte até 21 dias de idade, totalizando seis tratamentos, com oito repetições de 24 aves por unidade experimental. Aos 21 dias de idade, foram analisados o desempenho, histomorfometria intestinal, perfil bioquímico sanguíneo, saúde óssea e expressão gênica em frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G.

As aves foram mantidas em um aviário experimental com dimensões de 35 metros de comprimento por 13 metros de largura, dividido em seções contendo múltiplas unidades experimentais. Cada unidade experimental tinha uma área de 1,96 m² e estava equipada com comedouro tubular, bebedouros do tipo *nipple* e piso de concreto. O controle da temperatura ambiente foi realizado pelo painel Smaai IV, que operava a fornalha de aquecimento a pellets, os quatro exaustores e os painéis

evaporativos. O programa de iluminação seguiu as diretrizes do manual da linhagem. A refrigeração do ambiente e a renovação do ar eram asseguradas pelos exaustores e painéis evaporativos. As temperaturas média, mínima e máxima, assim como a umidade relativa, foram monitoradas diariamente e mantidas dentro da faixa de conforto térmico recomendada para cada fase.

Dietas experimentais

As dietas experimentais (Tabela 1) foram isonutritivas e isocalóricas, formuladas à base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2017). A inclusão de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta substituiu o material inerte na ração. As aves tiveram acesso *ad libitum* à água e a ração. Os tratamentos avaliados para o crescimento dos frangos de corte, provenientes de matrizes não suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G, consistiram na inclusão de 0,0; 50 e 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta. Para os frangos provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G, os tratamentos consistiram na adição de 0,0; 50 e 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G. A vitamina utilizada neste estudo (1,25(OH)₂D₃-G) foi proveniente do produto Panbonis® 10, obtido a partir de *Solanum glaucophyllum* em pó, padronizado com amido de trigo pré-gelatinizado e farelo de trigo. Sua composição analítica inclui 1,25(OH)₂D₃-G (mínimo de 10 ppm), umidade (máximo de 14%), proteína bruta (14-18%), fibra bruta (5,25-8,75%), extrato etéreo (3-6%), matéria mineral (3-6%), sódio (0,0-0,7%), lisina (0,6-0,9%) e metionina (0,2-0,4%).

Tabela 2. Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Pré-inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)
Milho (7,88%)	504,76	525,03
Farelo de soja (46%)	423,88	402,13
Óleo de soja degomado	29,70	33,66
Fosfato bicálcico	17,86	16,37
Calcário calcítico	9,39	8,64
Sal comum	4,02	3,68
Bicarbonato de sódio	1,00	1,50
Lisina sulfato (60%)	1,70	1,75
Lisina sulfato (54,7%)		
DL-Metionina (99%)	3,27	3,09
L-Treonina (99%)	0,47	0,42
Cloreto de colina (60%)	0,50	0,50
Adsorvente ¹	1,00	1,00
Premix vitamínico ²	1,30	1,00
Premix mineral ³	0,50	0,50
Coccidiostático ⁴	0,55	0,55
Enramicina ⁵		0,08
Inerte (caulim) ⁶	0,10	0,10
Composição nutricional calculada		
Energia metab. (kcal kg ⁻¹)	3000	3050
Proteína bruta (g kg ⁻¹)	240,471	231,848
Lisina digestível (g kg ⁻¹)	13,000	12,50
Met. + Cist. digestível (g kg ⁻¹)	9,620	9,250
Treonina digestível (g kg ⁻¹)	8,580	8,250

Valina digestível (g kg ⁻¹)	10,000	9,630
Trp. digestível (g kg ⁻¹)	2,804	2,688
Arginina digestível (g kg ⁻¹)	15,196	14,573
Cálcio (g kg ⁻¹)	9,500	8,780
Fósforo disponível (g kg ⁻¹)	4,500	4,190
Sódio (g kg ⁻¹)	2,000	2,000
Potássio (g kg ⁻¹)	9,372	9,039

¹Adisorvente – bentonita. ²Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta na ração pré-inicial: Vitamina A (min) 14.300 U.I.; Vitamina D₃ (min) 5.200 U.I.; Vitamina E (min) 71,50 U.I.; Vitamina K₃ (min) 3,90 mg; Vitamina B₁ (min) 2,99 0mg; Vitamina B₂ (min) 9,10 mg; Ácido pantotênico (min) 15,60 mg; Vitamina B₆ (min) 5,20 mg; Vitamina B₁₂ (min) 32,50 mg; Ácido nicotínico (min) 78,00 mg; Ácido fólico (min) 2,60 mg; Biotina (min) 0,33 mg; Selênio (min) 0,39 mg. Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta nas dietas inicial, crescimento e terminação: Vitamina A 11.000 UI; Vitamina D₃ 4.000 UI; Vitamina E 55 UI; Vitamina K₃ 3,00 mg; Tiamina (B₁) 2,30 mg; Riboflavina (B₂) 7,00 mg; Piridoxina (B₆) 4,00 mg; Cianocobalamina (B₁₂) 25,00 mg; Ácido pantotênico (B₅) 12,00 mg; Niacina (B₃) 60,00mg. Ácido fólico (B₉) 2,00 mg. Biotina (B₇) 0,25 mg. Selênio 0,30 g. ³Suplemento mineral, composição por kg de dieta: Ferro (min) 50g; Cobre (min) 10g; Manganês (min) 65g; Zinco (min) 65g; Iodo (min) 1000 mg. ⁴Anticoccidiano: de 1 a 21 dias de idade utilizado salinomicina 12% (Coxistac 12%) e de 22 a 35 dias de idade salinomicina 24% (Salinocox 24%). ⁵Enramicina 8% (Enradin 8%). ⁶Inerte a base de caulim, sendo a inclusão do 1,25(OH)₂D₃-G em função da substituição de peso por peso pelo inerte.

Desempenho

As aves e a ração foram pesadas no início do período experimental e aos 21 dias de idade para determinar o consumo médio de ração, o ganho de peso corporal e a conversão alimentar. A mortalidade foi registrada diariamente para ajuste do consumo de ração e da conversão alimentar (Sakomura & Rostagno, 2016).

Histomorfometria intestinal

Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental foi eutanasiada por deslocamento cervical para retirada do aparelho digestório para avaliação da morfometria intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta, área de absorção e relação vilo: cripta). O intestino delgado foi exposto e o jejuno foi separado para a amostragem. No jejuno, o segmento foi da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Coletou-se um fragmento de 2 cm do jejuno, a 5 cm antes do divertículo de Meckel. Esse fragmento foi fixado em solução de formalina tamponada (10%), desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em parafina. Em seguida, cortes semisseriados de 5 µm de cada segmento foram dispostos em lâminas de vidro e corados utilizando a técnica de hematoxilina-eosina, conforme descrito por Luna (1968).

As medições foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE 4.1. Em cada lâmina, foram registrados o comprimento e a largura dos vilos, assim como a profundidade e a largura das criptas. Essas medidas morfométricas foram utilizadas para calcular a área da superfície de absorção da mucosa intestinal, seguindo a fórmula descrita por Kisielinski et al. (2002). Com os resultados de altura de vilo e profundidade de cripta foi calculada a relação vilo:cripta.

Perfil bioquímico sanguíneo

Aos 21 dias de idade, dois frangos de corte próximos ao peso médio de cada repetição foram selecionados aleatoriamente para a coleta de sangue (4 mL) por punção da veia ulnar, enquanto as aves estavam posicionadas em decúbito lateral. As amostras foram analisadas para cálcio, fósforo, lactato desidrogenase, creatina fosfoquinase e fosfatase alcalina. Para a coleta, foram utilizados tubos a vácuo específicos com ativador de coágulo e capacidade de 5 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil), além de adaptadores e agulhas de 25 x 0,8 mm (Labor Import, Shandong Weigao, China). Após a coleta, as amostras foram mantidas em posição horizontal por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas (K14-4000, Kasvi, Paraná, Brasil) a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a separação do soro, as amostras foram devidamente identificadas, transferidas para microtubos de 2 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) e armazenadas em um freezer a -20°C até o momento da análise (Nunes et al., 2018).

Para as leituras, as amostras foram descongeladas sob refrigeração a 4°C e mantidas no refrigerador por no máximo 8 horas. Antes da análise, foram centrifugadas em uma microcentrífuga (Eppendorf®, modelo Minispin®, Hamburgo, Alemanha) a 1050 g por 10 minutos à temperatura ambiente para remoção de eventuais traços de fibrina. Os parâmetros bioquímicos foram mensurados utilizando um analisador bioquímico automático com espectrofotometria, especificamente o Flexor EL200 (marca Elitech®, modelo Flexor EL200, Puteaux, França). A análise foi conduzida com reagentes, calibradores (Elical II) e padrões de controle (Elitrol I) da marca Elitech®.

Resistência a quebra da tíbia e sua composição

As tíbias dos frangos eutanasiados aos 21 dias de idade foram utilizadas para a determinação da matéria seca em estufa com circulação de ar (105°C). Após esse processo, as amostras foram calcinadas por 8 horas em uma mufla a 600°C para a obtenção da matéria mineral (cinzas). Os teores de cálcio e fósforo no osso foram determinados seguindo a metodologia descrita por Silva & Queiroz (2006). A concentração de cálcio foi medida por espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS), enquanto o fósforo (P) foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-VIS).

A tíbia esquerda foi utilizada para determinar a resistência óssea por meio do analisador de textura Brookfield CT3. Esse equipamento possui uma base que sustenta as áreas epifisárias do osso, aplicando uma força de 5 mm s⁻¹ com uma carga de 200 kgf na região central do osso (diáfise). Durante a determinação da resistência, a tíbia foi posicionada no suporte sempre da mesma forma. Os resultados foram expressos em quilograma-força (kgf) (Crenshaw et al., 1981).

Expressão gênica

Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental recebeu estímulo através da administração intraperitoneal de 1 mg de LPS (lipopolissacarídeos de *E. coli*, Sigma) por peso corporal. Após 4 horas, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, imediatamente, um fragmento

do jejuno foi coletado e imerso na solução estabilizadora RNAlater™ (Invitrogen, EUA), que foi posteriormente armazenada em um freezer a -20°C até a extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando o *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen GmbH, Germany). Aproximadamente 70 mg de intestino de frango foi pesado, triturado e adicionado em microtubo, livre de DNase e RNase, contendo 500 µL de Trizol. As amostras foram homogeneizadas (vórtex), incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 100 µL de clorofórmio foi adicionado, seguido de homogeneização manual por 15 segundos. Após isso, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada por 15 minutos a $12.000 \times g$, a 4°C.

A fase aquosa foi coletada em novo tubo, e adicionado 250 µL de isopropanol, seguido por incubação por 10 minutos (temperatura ambiente) com homogeneização manual e centrifugação por 15 minutos a $12000 \times g$, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a $7500 \times g$ por 5 minutos, e o sobrenadante descartado para a secagem do *pellet*, por 15 minutos, e então ressuspensas em água ultrapura livre de DNase e RNase e incubadas a 60°C por 15 minutos.

A concentração de RNA para as interleucinas (IL-1β e IL-10), calbindina-D28K (CALB-D28K) e β-actina (gene para controle endógeno) foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA), no comprimento de onda de 260/280 nm, e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Safe™ DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) e visualizada em aparelho transiluminador com luz ultravioleta.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com as normas do fabricante, considerando 1 µg de RNA e volume final de 20 µL. Para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, cada amostra foi tratada com 2 µL de *gDNA Wipeout Buffer* (Qiagen GmbH, Germany) e incubada a 45°C por 2 min. Após remoção do DNA genômico, foi adicionado 4 µL *Quantiscript RT Buffer*, 1 µL *RT Primer Mix Reverse Transcription Mix* e 1 µL *Quantiscript Reverse Transcriptase*. A reação de transcriptase reversa foi incubada por 15 min a 42°C, seguida de 95°C por 3 min, sendo imediatamente colocada no gelo. As amostras foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Os *primers*/oligonucleotídeos utilizados nas reações foram obtidos a partir de trabalhos publicados de *Gallus gallus* (Tabela 2). As sequências dos *primers* foram alinhadas utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O gene da β-actina foi considerada como gene de referência/*housekeeping*, e sua estabilidade entre os tratamentos foi avaliada utilizando o programa *Statistica®* 7.0.

Tabela 2. Genes e sequências de primers.

Gene	Sequência de primers (5'→3')	Tamanho do amplicon (bp)	Referências
β -actina	F: TTCTTTTGGCGCTTGACTCA R: GCGTTCGCTCCAACATGTT	88	Proszkowiec-Weglarz <i>et al.</i> (2019)
CALB-D28K	F: TTGGCACTGAAATCCCACTGAA R: CATGCCAAGACCAAGGCTGA	116	NM_205513.2
IL-1 β	F: GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG R: TGTCGATGTCCCGCATGA	80	NM_204524.2
IL-10	F: CATGCTGCTGGGCCTGAA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	94	NM_001004414.4

Nota: CALB-D28K: Calbindina D28K; IL-1 β : Interleucina1 beta; IL-10: Interleucina 10.

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada *primer*, foi realizado diluições seriadas do *pool* de amostras de cDNA contendo todos os tratamentos, utilizando diferentes concentrações dos iniciadores. Para β -actina, CALB-D28K e IL-10 foi considerado 200 ng de cDNA e 400 nM de *primer*, e para IL-1 β , 200 ng cDNA e 600 nM de *primer*.

As análises de qRT-PCR foram conduzidas em Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germany), utilizando o *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* (Qiagen GmbH, Germany) em duplicatas. O volume total da reação foi de 20 μ l. As condições de amplificação foram: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 seg, e 60°C por 10 seg. A curva de dissociação (*melt curve*) dos produtos da reação foi obtida, para determinar a especificidade das reações.

Os dados de expressão gênica relativa foram registrados como valores de Ct (cycle threshold) e foram normalizados utilizando a média dos valores de Ct obtidos para o gene de referência em cada amostra, para cada tratamento e para cada gene alvo, conforme recomendado por Vandesompele *et al.* (2002). O método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usado para quantificação relativa da expressão gênica (expressa como unidades arbitrárias, AU).

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade da variância pelo teste de Levene, ambos realizados através do procedimento Univariate. Para os dados com distribuição normal, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) bifatorial para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G em matrizes e frangos de corte, bem como possíveis interações entre esses fatores. Quando efeitos significativos foram detectados, as médias dos tratamentos para as matrizes foram comparadas pelo teste F, enquanto as médias dos tratamentos para os frangos de corte foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SAS com um nível de significância de 5% e, quando necessário, de 10% (SAS, 2014).

RESULTADOS

Desempenho, histomorfometria intestinal e parâmetros bioquímicos sanguíneos

O desempenho (Tabela 3), a histomorfometria intestinal (Tabela 4) e os parâmetros bioquímicos sanguíneo (Tabela 5) dos frangos de corte aos 21 dias de idade não apresentaram interação significativa ($P > 0,05$) entre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes e nos frangos e corte. No entanto, matrizes suplementadas com 100 mg kg^{-1} de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ produziram frangos de corte mais pesados ao nascimento ($P < 0,001$).

Tabela 3. Desempenho de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D_3 , provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D_3 (mg kg^{-1})	PIM (g)	CRM (g)	GPM (g)	CA (g g^{-1})
Vit D_3 Matrizes				
0,0	42,97 ^b	1168	956	1,218
100	43,78 ^a	1167	949	1,224
Vit D_3 Frangos				
0,0	43,31	1163	940	1,228
50	43,43	1162	956	1,211
100	43,33	1177	962	1,223
¹ EPM	0,50	33,82	27,30	0,03
<i>P</i> valor				
Vit D_3 Matrizes	0,001	0,993	0,459	0,463
Vit D_3 Frangos	0,859	0,371	0,069	0,158
Vit D_3 Matrizes x Vit D_3 Frangos - Interação	0,911	0,368	0,213	0,062

Vit D_3 : $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). PIM: Peso inicial médio; CRM Consumo de ração médio; GPM: Ganho de peso médio; CA: Conversão alimentar; EPM: Erro padrão da média; Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Tabela 4. Histomorfometria do jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D_3 , provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D_3 levels (mg kg^{-1})	AV (μm)	PC (μm)	AA (μm^2)	V:C (μm)
Vit D_3 Matrizes				
0,0	778,16	47,91	15,93	15,72
100	762,61	44,00	17,50	17,08
Vit D_3 Frangos				
0,0	755,65	44,89	16,21	16,51
50	762,02	47,08	14,93	16,50
100	792,07	45,70	18,09	17,15
¹ EPM	159,70	10,20	3,86	3,16
<i>P</i> valor				
Vit D_3 Matrizes	0,732	0,180	0,244	0,102
Vit D_3 Frangos	0,807	0,877	0,078	0,842

Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,580	0,061	0,211	0,801
--	-------	-------	-------	-------

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). AV: Altura do vilo; PC: Profundidade da cripta; V:C: Relação vilo:cripta. ¹EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - inteiração: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G.

Tabela 5. Concentrações de cálcio, fósforo e atividade enzimática sérica de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg kg ⁻¹)	Ca (mg dL ⁻¹)	P (mg dL ⁻¹)	LDH (U L ⁻¹)	CPK (U L ⁻¹)	FA (U L ⁻¹)
Vit D ₃ Matrizes					
0,0	8,33	5,48	1099	3965	25528
100	8,48	5,49	1066	4022	26280
Vit D ₃ Frangos					
0,0	8,44	5,49	1158	4689	31379
50	8,33	5,56	1100	3909	24414
100	8,44	5,41	1005	3410	21919
¹ EPM	1,53	0,57	335	3363	11287
P valor					
Vit D ₃ Matrizes	0,725	0,963	0,869	0,964	0,818
Vit D ₃ Frangos	0,974	0,739	0,443	0,508	0,059
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,444	0,973	0,491	0,125	0,737

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). Ca: Cálcio; P: Fósforo; LDH: Lactato desidrogenase; CPK: Creatina fosfoquinase; FA Fosfatase alcalina. ¹EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - inteiração: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G.

Resistência a quebra da tíbia e sua composição

A deposição de fósforo na tíbia de frangos de corte aos 21 dias de idade apresentou interação significativa ($P < 0,026$) entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 6). Além disso, matrizes suplementadas com 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G resultaram em frangos de corte com maior resistência à quebra da tíbia aos 21 dias de idade. Além disso, aos 21 dias, observou-se menor deposição de matéria seca ($P < 0,007$) e maior deposição de cálcio ($P < 0,046$) e fósforo ($P < 0,001$) na tíbia de frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G. A interação entre matrizes e frangos suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G resultou em maior deposição de fósforo na tíbia de frangos aos 21 dias de idade quando suplementados com 0,0 e 50 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G ($P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente) e provenientes de matrizes suplementadas com a vitamina (Tabela 7).

Tabela 6. Resistência à quebra da tíbia e composição bromatológica da tíbia expressa na matéria seca de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg kg ⁻¹)	RQT (kgf)	MS (%)	Ca (%)	P (%)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	29,10 ^b	41,50 ^a	16,49 ^b	9,19 ^b
100	39,64 ^a	40,48 ^b	18,60 ^a	10,50 ^a
Vit D ₃ Frangos				
0,0	30,93	40,85 ^{AB}	15,75	9,84
50	28,63	40,36 ^B	16,96	10,00
100	28,54	41,75 ^A	16,94	9,78
¹ EPM	4,27	1,25	1,94	0,69
<i>P</i> valor				
Vit D ₃ Matrizes	0,006	0,007	0,046	0,001
Vit D ₃ Frangos	0,212	0,010	0,140	0,938
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,259	0,060	0,179	0,026

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). MS: Matéria seca; Ca: Cálcio; P: Fósforo; RQT: Resistência a quebra da tíbia; EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Tabela 7. Desdobramento da interação entre a suplementação de vitamina D₃ nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto nas concentrações de fósforo na tíbia de frangos aos 21 dias de idade.

Vit D ₃ Frangos (mg kg ⁻¹)	Vit D ₃ em Matrizes (mg kg ⁻¹)		<i>P</i> Valor
	0,0	100	
0,0	9,06 ^B	10,63 ^A	0,001
50	8,93 ^B	10,81 ^A	0,001
100	9,52	10,05	0,185
<i>P</i> Valor	0,206	0,119	

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). MS: Matéria seca; Ca: Cálcio; P: Fósforo; RQT: Resistência a quebra da tíbia; EPM: Erro padrão da média. ^{A,B}: Médias seguidas de letras maiúscula diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Expressão gênica

As concentrações de interleucina 10 em frangos de corte aos 21 dias de idade apresentaram interação significativa entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G ($P < 0,007$). Além disso, matrizes suplementadas com 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G resultaram em frangos de corte com maior expressão gênica de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1 β aos 21 dias de idade (Tabela 8). A interação entre matrizes e frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G resultou em maiores concentrações de interleucina 10 nos frangos de corte aos 21 dias de idade quando suplementados com 50 e 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G ($P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente), sendo esses frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com o mesmo aditivo (Tabela 9).

Tabela 8. Expressão gênica no jejuno de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg kg ⁻¹)	Calbindina D28K	Interleucina 10	Interleucina 1β
Vit D ₃ Matrizes			
0,0	0,173 ^b	0,807 ^b	1,489 ^b
100	0,248 ^a	1,319 ^a	2,094 ^a
Vit D ₃ Frangos			
0,0	0,222	1,184	2,156 ^A
50	0,204	0,973	1,591 ^B
100	0,206	1,207	1,599 ^B
¹ EPM	0,071	0,340	0,660
<i>P</i> valor			
Vit D ₃ Matrizes	0,004	0,001	0,011
Vit D ₃ Frangos	0,451	0,118	0,015
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,593	0,007	0,793

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x Frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G. ^{ab}: médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si segundo o teste de Student-Newman-Keuls a 5%; ^{AB}: médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si segundo o teste F a 5%.

Tabela 9. Desdobramento da interação entre a suplementação de vitamina D₃ nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na expressão gênica de Interleucina 10 no jejuno de frangos com 21 dias de idade.

Vit D ₃ em Frangos (mg kg ⁻¹)	Vit D ₃ em Matrizes (mg kg ⁻¹)		
	0,0	100	<i>P</i> Valor
0,0	0,500 ^{bB}	1,225	0,754
50	0,598 ^{bB}	1,194 ^A	0,001
100	1,048 ^{aB}	1,392 ^A	0,001
<i>P</i> Valor	0,001	0,372	

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). ^{ab}: médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si segundo o teste de Student-Newman-Keuls a 5%; ^{AB}: médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si segundo o teste F a 5%.

DISCUSSÃO

A suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes teve impacto direto no aumento do peso dos frangos de corte ao nascimento, conforme observado nos resultados. A forma ativa da vitamina D₃, o metabólito 1,25(OH)₂D₃-G, favoreceu a absorção de cálcio e fósforo nas matrizes, aumentando a disponibilidade desses minerais durante a formação do ovo (Barnkob et al., 2020; San et al., 2021). Durante esse processo, os minerais foram incorporados à casca e à gema, fornecendo uma reserva para o embrião (Fatemi et al., 2022, 2024). Essa maior disponibilidade de cálcio e fósforo para o embrião foi essencial para a mineralização óssea adequada e o desenvolvimento inicial do pinto, refletindo-se no maior peso ao nascimento (Li et al., 2021; Yusuf et al., 2023).

Essa maior disponibilidade de cálcio e fósforo desde os estágios iniciais de vida proporcionou uma base sólida para o desenvolvimento ósseo contínuo, como evidenciado pela maior deposição desses minerais na tíbia de frangos de corte aos 21 dias de idade provenientes de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. A maior concentração desses minerais nos ossos aos 21 dias resultou em uma estrutura óssea mais mineralizada, reduzindo as taxas de fratura tibial (Colet et al., 2015; Vieites et al., 2016; Han et al., 2024; Wei et al., 2024). Esse resultado indica que a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta das matrizes não apenas melhorou a condição esquelética inicial dos frangos de corte, mas também sustentou o fortalecimento ósseo ao longo do crescimento (Chen et al., 2021; Han et al., 2024).

Aos 21 dias de idade, também foi observada maior expressão de calbindina D28K no jejuno de frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Esse aumento na expressão da calbindina D28K teve um papel crucial na maior deposição de cálcio e mineralização óssea nesses frangos de corte (Shojadoost et al., 2021). A calbindina D28K é uma proteína transportadora de cálcio cuja síntese é regulada pela vitamina D, sendo essencial para o transporte intracelular eficiente desse mineral, especialmente no intestino, facilitando sua absorção (Hsiao et al., 2018; Kumar et al., 2017, 2023). Nesse contexto, a maior expressão de calbindina D28K no jejuno reflete a ação fisiológica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ no processo de mobilização do cálcio, permitindo uma distribuição mais eficiente desse mineral para os ossos (Aye Cho et al., 2020; Wu et al., 2022).

Outro aspecto relevante é a possível interação entre a maior disponibilidade de cálcio e fósforo e a redução na deposição de matéria seca na tíbia de frangos de corte aos 21 dias de idade, provenientes de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Embora uma menor deposição de matéria seca não indique necessariamente redução no crescimento ósseo, pode sugerir uma otimização da estrutura óssea, com a mineralização ocorrendo de forma mais eficiente na formação de ossos mais fortes e resistentes, sem aumento desnecessário de matriz óssea não mineralizada (Shao et al., 2019; Tay-Zar et al., 2019; Aye Cho et al., 2020). Isso é particularmente importante, pois a mineralização adequada garante que o cálcio seja eficientemente incorporado à estrutura óssea, proporcionando maior resistência a fraturas sem a necessidade de um excesso de matriz óssea não mineralizada, o que poderia comprometer a durabilidade óssea a longo prazo (Vieites et al., 2016; Alves et al., 2018; Yavaş et al., 2020; Chen et al., 2021).

Nesse contexto, os resultados indicam que a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ em matrizes beneficiou os frangos de corte, não apenas promovendo maior mineralização óssea e resistência a fraturas, mas também favorecendo um equilíbrio adequado entre mineralização e matriz óssea (Souza e Vieites, 2014; Vieites et al., 2018; Li et al., 2021). Esse equilíbrio resultou em ossos mais fortes e com maior resistência mecânica, aspectos essenciais para garantir um desempenho produtivo ideal aos 21 dias de idade (Souza et al., 2020; Wu et al., 2022). Isso impacta diretamente na prevenção de problemas locomotores, que, em sistemas de produção, podem levar a perdas econômicas significativas (Vieites et al., 2016, 2017; Aye Cho et al., 2020; Shojadoost et al., 2021).

A suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes resultou em uma modulação significativa da resposta imune nos frangos de corte, evidenciada pelo aumento da produção de interleucinas 10 e 1β no intestino dos frangos de corte aos 21 dias de idade. A interleucina 10 é uma citocina anti-inflamatória crucial para a regulação da resposta imune, promovendo a tolerância imunológica e prevenindo reações inflamatórias excessivas que poderiam causar danos teciduais (Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020). Desempenha um papel essencial na manutenção do equilíbrio imunológico, limitando respostas inflamatórias descontroladas que poderiam comprometer a homeostase do organismo (Kumar et al., 2017; Nunes et al., 2020).

A interleucina 10 também tem um papel importante na supressão de respostas imunes, permitindo uma recuperação eficiente após eventos inflamatórios, o que pode ser particularmente relevante no trato intestinal, onde inflamações crônicas podem prejudicar a absorção de nutrientes e o crescimento das aves (Nunes et al., 2020; Shojadoost et al., 2021; Babazadeh et al., 2022). Em resposta à suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes, o aumento na produção de interleucina 10 sugere que a vitamina D₃, por meio de sua forma ativa (1,25(OH)₂D₃-G), pode ter contribuído para uma regulação mais eficaz da resposta imune, protegendo os frangos de corte de processos inflamatórios (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Kumar et al., 2023; Han et al., 2024).

Por outro lado, a interleucina 1β, uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel fundamental na ativação da resposta imune inata (Shojadoost et al., 2021; Nong et al., 2023). Está envolvida na detecção e resposta inicial a patógenos, sendo crucial para a defesa contra infecções, especialmente no trato gastrointestinal. A interleucina 1β ativa macrófagos e células dendríticas, além de induzir febre, um mecanismo fisiológico que ajuda a limitar a replicação de microrganismos patogênicos (Sakkas et al., 2019; Nunes et al., 2020).

Neste contexto, a suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes pode ter influenciado positivamente a produção de interleucina 1β nos frangos, promovendo uma resposta imune mais rápida e eficaz diante de desafios infecciosos (Jaime et al., 2020; Nong et al., 2023). A ativação inicial da resposta imune inata, mediada pela interleucina 1β, é essencial para a defesa precoce contra patógenos e para a coordenação das respostas inflamatórias subsequentes (Shojadoost et al., 2021; Babazadeh et al., 2022). A presença de níveis elevados tanto de interleucina 10 quanto de interleucina 1β, conforme observado nos frangos aos 21 dias de idade, sugere que a suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes promoveu um equilíbrio dinâmico e eficaz entre as respostas imunes pró- e anti-inflamatórias (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Nunes et al., 2020).

Esse equilíbrio entre a interleucina 10, com sua ação anti-inflamatória, e a interleucina 1β, com sua função pró-inflamatória, é essencial para o desenvolvimento de um sistema imune eficiente e adaptativo nos frangos (Chou et al., 2021; Nong et al., 2023). A regulação adequada dessas citocinas permite que o organismo responda eficazmente a infecções sem causar danos a órgãos e tecidos vitais, como o intestino (Fatemi et al., 2024; Mathis et al., 2016; Shojadoost et al., 2021). Neste contexto, a modulação positiva da produção dessas interleucinas nos frangos pode trazer efeitos benéficos sobre o

crescimento e o desempenho geral, além de contribuir para uma resposta imune mais eficaz durante os estágios iniciais de vida (Hsiao et al., 2018; Babazadeh et al., 2022; Khan et al., 2023). Além disso, a manutenção de uma mucosa intestinal saudável, protegida contra inflamações, pode favorecer a absorção adequada de nutrientes, melhorando o crescimento ósseo, a resistência a fraturas e, consequentemente, o desempenho produtivo das aves (Colet et al., 2015; Vieites et al., 2016, 2017; Alves et al., 2018; Han et al., 2024).

CONCLUSÃO

A suplementação de 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes contribuiu para o aumento do peso ao nascimento e para a melhoria da saúde óssea dos frangos aos 21 dias de idade, com maior deposição de fósforo e cálcio, além de maior resistência à quebra da tíbia. Além disso, essa suplementação elevou as concentrações de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1β nos frangos aos 21 dias de idade. Os frangos suplementados com 50 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram maior deposição de fósforo na tíbia, e aqueles suplementados com 50 e 100 mg kg⁻¹ tiveram maiores concentrações de interleucina 10 quando provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg kg⁻¹ de 1,25(OH)₂D₃-G.

REFERÊNCIAS

- Adhikari, R., White, D., House, J. D., & Kim, W. K. (2020). 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. *Poultry Science*, 99(1), 364–373. <https://doi.org/10.3382/ps/pez502>
- Akinyemi, F., & Adewole, D. (2021). Environmental Stress in Chickens and the Potential Effectiveness of Dietary Vitamin Supplementation. *Frontiers in Animal Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fanim.2021.775311>
- Alves, O. dos S., Calixto, L. F. L., Araujo, A. H. B., Torres-Cordido, K. A. A., Reis, T. L., & Calderano, A. A. (2018). Decreased levels of vitamin D3 and supplementation with 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. *Ciência Rural*, 48(8). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170705>
- Anderson, P. H. (2017). Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Current Osteoporosis Reports*, 15(5), 443–449. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0394-8>
- Asnayanti, A., Alharbi, K., Do, A. D. T., Al-Mitib, L., Bühler, K., Van der Klis, J. D., Alrubaye, A. A. K. (2024). Early 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosides supplementation: an efficient feeding strategy against bacterial chondronecrosis with osteomyelitis lameness in broilers assessed by using an aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research*, 33(3), 100440. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100440>
- Aye Cho, T.-Z., Sadiq, M. B., Srichana, P., & Anal, A. K. (2020). Vitamin D3 enhanced intestinal phosphate cotransporter genes in young and growing broilers. *Poultry Science*, 99(4), 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.038>
- Babazadeh, D., Razavi, S. A., Abd El-Ghany, W. A., & F Cotter, P. (2022). Vitamin D Deficiency in Farm Animals: A Review. *Farm Animal Health and Nutrition*, 1(1), 10–16. <https://doi.org/10.58803/fahn.v1i1.7>
- Barnkob, L. L., Argyraki, A., & Jakobsen, J. (2020). Naturally enhanced eggs as a source of vitamin D: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.018>
- Castro, F. L. de S., Baião, N. C., Ecco, R., Louzada, M. J. Q., Melo, É. de F., Saldanha, M. M., Lara, L. J. C. (2018). Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D3 level on broiler performance and bone quality. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47(0). <https://doi.org/10.1590/rbz4720170186>
- Chen, C., Adhikari, R., White, D. L., & Kim, W. K. (2021). Role of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Osteogenic Differentiation and Mineralization of Chicken Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.479596>
- Chou, P.-C., Lin, P.-C., Wu, S.-W., Wang, C.-K., Chung, T.-K., Walzem, R. L. Chen, S.-E. (2021). Differential Modulation of 25-hydroxycholecalciferol on Innate Immunity of Broiler Breeder Hens. *Animals*, 11(6), 1742. <https://doi.org/10.3390/ani11061742>

- Colet, S., Garcia, R., Almeida Paz, I., Caldara, F., Borille, R., Royer, A., Sgavioli, S. (2015). Bone characteristics of broilers supplemented with vitamin D. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17(3), 325–332. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1703325-332>
- Crenshaw, T. D., Peo, E. R., Lewis, A. J., & Moser, B. D. (1981). Bone Strength as a Trait for Assessing Mineralization in Swine: a Critical Review of Techniques Involved. *Journal of Animal Science*, 53(3), 827–835. <https://doi.org/10.2527/jas1981.533827x>
- Fatemi, S.A., Elliott, K. E. C., Bello, A., & Peebles, E. D. (2021). Effects of the in ovo injection of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in Ross 708 broilers subsequently challenged with coccidiosis. I. performance, meat yield and intestinal lesion incidence^{1,2,3}. *Poultry Science*, 100(10), 101382. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101382>
- Fatemi, S.A., Levy, A. W., & Peebles, E. D. (2024). Ross 708 broiler small intestine morphology and immunity improvements in response to in ovo Marek's Disease vaccine administration alone or in conjunction with in ovo and dietary supplemental calcifediol. *Poultry Science*, 103(10), 104098. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104098>
- Fatemi, Seyed Abolghasem, Elliott, K. E. C., Macklin, K. S., Bello, A., & Peebles, E. D. (2022). Effects of the In Ovo Injection of Vitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D3 in Ross 708 Broilers Subsequently Challenged with Coccidiosis: II Immunological and Inflammatory Responses and Small Intestine Histomorphology. *Animals*, 12(8), 1027. <https://doi.org/10.3390/ani12081027>
- Fatemi, Seyed Abolghasem, Elliott, K. E. C., Bello, A., Durojaye, O. A., Zhang, H.-J., & Peebles, E. D. (2020). The effects of in ovo injected vitamin D3 sources on the eggshell temperature and early posthatch performance of Ross 708 broilers. *Poultry Science*, 99(3), 1357–1362. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.055>
- Geng, Y., Ma, Q., Wang, Z., & Guo, Y. (2018). Dietary vitamin D3 supplementation protects laying hens against lipopolysaccharide-induced immunological stress. *Nutrition & Metabolism*, 15(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0293-8>
- Gili, V., Pardo, V. G., Ronda, A. C., De Genaro, P., Bachmann, H., Boland, R., & de Boland, A. R. (2016). In vitro, the effects of 1 α ,25(OH)₂D₃-glycosides from Solbone A (*Solanum glaucophyllum* leaves extract; Herbonis AG) compared to synthetic 1 α ,25(OH)₂D₃ on myogenesis. *Steroids*, 109, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.03.002>
- Han, J., Lv, X., He, L., Liu, M., Qu, H., Xi, L., Wang, Z. (2024). MAPK signaling pathway participates in the regulation of intestinal phosphorus and calcium absorption in broiler chickens via 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Poultry Science*, 103(10), 104052. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104052>
- Han, J., Wu, L., Lv, X., Liu, M., Zhang, Y., He, L., Qiao, Y. (2022). Intestinal segment and vitamin D3 concentration affect gene expression levels of calcium and phosphorus transporters in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Technology*. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e78>
- Hsiao, F. S.-H., Cheng, Y.-H., Han, J.-C., Chang, M.-H., & Yu, Y.-H. (2018). Effect of different vitamin D3 metabolites on intestinal calcium homeostasis-related gene expression in broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47(0). <https://doi.org/10.1590/rbz4720170015>
- Jaime, J., Vargas-Bermúdez, D. S., Yitbarek, A., Reyes, J., & Rodríguez-Lecompte, J. C. (2020). Differential immunomodulatory effect of vitamin D (1,25(OH)₂D₃) on the innate immune response in different types of cells infected in vitro with infectious bursal disease virus. *Poultry Science*, 99(9), 4265–4277. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.006>
- Kanaani, R., R. Kianfar., H. Janmohammadi., W. K. K., M. Olyaei. (2022). Influence of vitamin D3 and lactic acid on performance, egg quality, and hatchability in broiler breeder hens. *Animal Production Research*, 11, 67–81.
- Kanani, R., Kianfar, R., Janmohammadi, H., Kyun Kim, W., & Olyaei, M. (2022). Influence of vitamin D3 and lactic acid on performance, egg quality, and hatchability in broiler breeder hens. *Animal Production Research*, 11(3), 67–81. <https://doi.org/10.22124/ar.2022.21551.1683>
- Khan, R. U., Naz, S., Ullah, H., Khan, N. A., Laudadio, V., Ragni, M., Tufarelli, V. (2023). Dietary vitamin D: growth, physiological and health consequences in broiler production. *Animal Biotechnology*, 34(4), 1635–1641. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2013861>
- Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2002). A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and Experimental Medicine*, 2(3), 131–135. <https://doi.org/10.1007/s102380200018>
- Kumar, R., Brar, R. S., & Banga, H. S. (2017). Hypervitaminosis D3 in broiler chicks: histopathological, immunomodulatory and immunohistochemical approach. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(3), 170–176.
- Kumar, Rahul, Singh Banga, H., & Singh Brar, R. (2023). Effects of Dietary Vitamin D3 Over-Supplementation on Broiler Chickens' Health; Clinicopathological and Immunohistochemical Characteristics. *Journal of Veterinary Physiology and Pathology*, 2(2), 20–31. <https://doi.org/10.58803/jvpp.v2i2.21>

- Landy, N., & Toghyani, M. (2018). Evaluation of one-alpha-hydroxy-cholecalciferol alone or in combination with cholecalciferol in Ca P deficiency diets on development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *Animal Nutrition*, 4(1), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.11.002>
- Li, D., Zhang, K., Bai, S., Wang, J., Zeng, Q., Peng, H., Ding, X. (2021). Effect of 25-Hydroxycholecalciferol with Different Vitamin D3 Levels in the Hens Diet in the Rearing Period on Growth Performance, Bone Quality, Egg Production, and Eggshell Quality. *Agriculture*, 11(8), 698. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080698>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luna, L. G. (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Pathology* (Vol. 3). New York.
- Lv, X., Hao, J., Wu, L., Liu, M., He, L., Qiao, Y., Han, J. (2022). Age quadratically affects intestinal calcium and phosphorus transporter gene expression in broiler chickens. *Animal Bioscience*, 35(12), 1921–1928. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0058>
- Marques, M., Oliveira, R., Donzele, J., Albino, L., Tizziani, T., Faria, L., Silva, C. (2022). 25-Hydroxycholecalciferol As an Alternative to Vitamin D3 in Diets with Different Levels of Calcium for Broilers Reared Under Heat Stress. *Brazilian Journal of Poultry Science*. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1559>
- Mathis, G., Boland, R., Bachmann, H., Toggenburger, A., & Rambeck, W. (2016). Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D3 of herbal origin in broiler chicken. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 158(12), 819–826. <https://doi.org/10.17236/sat00097>
- Nong, K., Liu, Y., Fang, X., Qin, X., Liu, Z., & Zhang, H. (2023). Effects of the Vitamin D3 on Alleviating the Oxidative Stress Induced by Diquat in Wenchang Chickens. *Animals*, 13(4), 711. <https://doi.org/10.3390/ani13040711>
- Nunes, R. A., Duarte, M. de S., Campos, P. H. R. F., de Oliveira, L. L., Silva, F. F., Kreuz, B. S., Calderano, A. A. (2020). Active vitamin D3-glycoside preserves weight gain and modulates the inflammatory response in broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Animal Feed Science and Technology*, 270, 114704. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114704>
- Nunes, R. V., Broch, J., Wachholz, L., de Souza, C., Damasceno, J. L., Oxford, J. H., Pesti, G. M. (2018). Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. *Poultry Science*, 97(10), 3746–3754. <https://doi.org/10.3382/ps/pey217>
- Rodriguez-Lecompte, J. C., Yitbarek, A., Cuperus, T., Echeverry, H., & van Dijk, A. (2016). The immunomodulatory effect of vitamin D in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels. *Poultry Science*, 95(11), 2547–2556. <https://doi.org/10.3382/ps/pew186>
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Calderano, A. A., Hanas, M. I., Sakomura, N. K., Perazzo, F., Tavernari, F. C. (2024). *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais* (Suprema, Vol. 5). Visconde do Rio Branco.
- Sakkas, P., Smith, S., Hill, T. R., & Kyriazakis, I. (2019). A reassessment of the vitamin D requirements of modern broiler genotypes. *Poultry Science*, 98(1), 330–340. <https://doi.org/10.3382/ps/pey350>
- Sakkas, Panagiotis, Oikeh, I., Blake, D. P., Smith, S., & Kyriazakis, I. (2019). Dietary vitamin D improves performance and bone mineralisation but increases parasite replication and compromises gut health in *Eimeria*-infected broilers. *British Journal of Nutrition*, 122(6), 676–688. <https://doi.org/10.1017/S0007114519001375>
- Sakomura, N. K., & Rostagno, S. H. (2016). *Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos* (Vol. 2; FUNEP, Ed.). Jaboticabal.
- San, J., Zhang, Z., Bu, S., Zhang, M., Hu, J., Yang, J., & Wu, G. (2021). Changes in duodenal and nephritic Ca and P absorption in hens during different egg-laying periods. *Heliyon*, 7(1), e06081. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06081>
- SAS Institute. (2014). *SAS University Edition: Installation Guide for Windows*.
- Saunders-Blades, J. L., & Korver, D. R. (2015). Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poultry Science*, 94(6), 1233–1246. <https://doi.org/10.3382/ps/pev002>
- Setiyaningsih, N., Jayanegara, A., & Wardani, W. W. (2023). Effects of a Vitamins D and C Supplement on Performance, Hatchability and Blood Profiles of Broiler Breeders. *Journal of World's Poultry Research*. <https://doi.org/10.36380/jwpr.2023.7>
- Shao, Y., Wen, Q., Zhang, S., Lu, L., Zhang, L., Liao, X., & Luo, X. (2019). Dietary supplemental vitamin D enhances phosphorus absorption and utilisation by regulating gene expression of related phosphate transporters in the small intestine of broilers. *British Journal of Nutrition*, 121(1), 9–21. <https://doi.org/10.1017/S0007114518002763>
- Shojadoost, B., Yitbarek, A., Alizadeh, M., Kulkarni, R. R., Astill, J., Boodhoo, N., & Sharif, S. (2021). Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. *Poultry Science*, 100(4), 100930. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.027>

- Silva, D. J., & Queiroz, A. C. (2006). *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos* (Vol. 3). Viçosa.
- Souza, C. S., & Vieites, F. M. (2014). Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. *Archivos de Zootecnia*, 63(241), 11–24. <https://doi.org/10.21071/az.v63i241.588>
- Souza, Christiane Silva, Vieites, F. M., Nunes, R. V., Brusamarello, E., Reis, T. L., Lima, C. A. R. de, & Vargas Júnior, J. G. de. (2020). Suplemento de 1,25-dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte fêmeas. *Research, Society and Development*, 9(7), e119973975. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3975>
- Souza, C.S., Vieites, F. M., Vasconcellos, C. H. F., Calderano, A. A., Nunes, R. V., Ferreira, C. M., Moraes, G. H. K. (2013). Suplemento de 1,25 dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(2), 519–525. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200031>
- Suarez, J. C., Knape, K., Ali, N. A., Aljuboori, J., Al-Alwani, T., Gutierrez, O., & Carey, J. B. (2023). Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol and its impact on performance, intestinal morphology, and vitamin D status in broilers subjected to coccidiosis vaccine. *Journal of Applied Poultry Research*, 32(4), 100360. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2023.100360>
- Tay-Zar, A. C., Srichana, P., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2019). Restriction of dietary non-phytate phosphorus on growth performance and expression of intestinal phosphate cotransporter genes in broilers. *Poultry Science*, 98(10), 4685–4693. <https://doi.org/10.3382/ps/pez171>
- Vazquez, J. R., Gómez, G. V., López, C. C., Cortés, A. C., Díaz, A. C., Fernández, S. R. T., Avila, A. G. (2018). Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D 3 vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1). <https://doi.org/10.1111/jpn.12715>
- Vieites, Flávio Medeiros, Drosghic, L. C. A. B., Souza, C. S., Vargas Júnior, J. G., Nunes, R. V., Moraes, G. H. K. de Caramori Júnior, J. G. (2016). Características ósseas de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1), 381. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p381>
- Vieites, F.M., Drosghic, L. C. A. B., Souza, C. S., Lima, C. A. R., Moraes, G. H. K., Nunes, R. V., Vargas Júnior, J. G. (2017). 1,25-dihidroxitamina-D3 sobre as características ósseas de frangos de corte fêmeas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(5), 1285–1293. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9371>
- Vieites, F.M., Brusamarello, E., Corrêa, G. da S. S., Souza, C. S., De Oliveira, C. F. S., De Moraes, G. H. K., & Caramori Júnior, J. G. (2018). 1,25-dihidroxicolecalciferol de origem herbal (*Solanum glaucophyllum*) mantém o desempenho e a qualidade óssea de frangos de corte fêmeas durante restrição de cálcio e fósforo. *Archivos de Zootecnia*, 67(259), 414–419. <https://doi.org/10.21071/az.v67i259.3799>
- Wei, J., Li, L., Peng, Y., Luo, J., Chen, T., Xi, Q., Sun, J. (2024). The Effects of Optimal Dietary Vitamin D3 on Growth and Carcass Performance, Tibia Traits, Meat Quality, and Intestinal Morphology of Chinese Yellow-Feathered Broiler Chickens. *Animals*, 14(6), 920. <https://doi.org/10.3390/ani14060920>
- Wen, J., Livingston, K. A., & Persia, M. E. (2019). Effect of high concentrations of dietary vitamin D3 on pullet and laying hen performance, skeleton health, eggshell quality, and yolk vitamin D3 content when fed to W36 laying hens from day of hatch until 68 wk of age. *Poultry Science*, 98(12), 6713–6720. <https://doi.org/10.3382/ps/pez386>
- Wu, L., Wang, X., Lv, X., He, L., Qu, H., Shi, C., Han, J. (2022). 1,25-Dihydroxycholecalciferol Improved the Growth Performance and Upregulated the Calcium Transporter Gene Expression Levels in the Small Intestine of Broiler Chickens. *The Journal of Poultry Science*, 59(2), 0210019. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210019>
- Yavaş, İ., Çenesiz, A. A., & Ceylan, N. (2020). Effects of Herbal Vitamin D3 and Phytase Supplementation to Broiler Feed on Performance, Bone Development and Serum Parameters of Broilers. *Tarım Bilimleri Dergisi*. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.479182>
- Yusuf, G. M., Sumiati, S., Mutia, R., Wardani, W. W., Akbar, I., & Putri, N. D. S. (2023). Performance, Egg Quality, Bone Health, and Immunity Assessments of Lohmann Laying Hens Supplemented with Vitamin D3 in the Diet. *Tropical Animal Science Journal*, 46(4), 461–470. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.4.461>

Frangos de corte suplementados com glicosídeo de 1,25-dihidroxicolecalciferol, oriundos de matrizes com 46 semanas de idade, suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Resumo

Este estudo investigou os efeitos da suplementação com 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$) sobre o desempenho, rendimento de carcaça, cortes, parâmetros bioquímicos sanguíneos, histomorfometria intestinal, saúde óssea e expressão gênica em frangos de corte aos 42 dias de idade, provenientes de matrizes (21 a 46 semanas de idade) suplementadas ou não com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Um total de 1.152 pintos machos de um dia da linhagem Ross 308 AP foi distribuído em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×3 . Um fator considerou a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta das matrizes (0,0 e 100 mg/kg), e o outro fator envolveu três níveis (0,0; 50 e 100 mg/kg) de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte até os 21 dias de idade, totalizando seis tratamentos, com oito repetições de 24 aves por unidade experimental. A suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes resultou em frangos de corte mais pesados ao nascimento e com maior altura de vilosidade, maior área de absorção e maior relação vilo:cripta no jejuno aos 42 dias de idade. Além disso, estes frangos de corte apresentaram menor concentração sérica de cálcio, maior deposição de cálcio e fósforo na tíbia, maior resistência à quebra da tíbia e maior expressão de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina-1 β aos 42 dias, quando provenientes das matrizes suplementadas com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Enquanto a inclusão de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte promoveu maior ganho de peso e melhor resposta imune aos 42 dias de idade. Conclui-se que a suplementação de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta das matrizes é recomendada para melhorar o peso dos pintos ao nascimento, bem como a saúde óssea e intestinal dos frangos de corte aos 42 dias de idade, enquanto a concentração de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte melhora o ganho de peso aos 42 dias de idade.

Palavras-chave: Osso; resposta imune; desempenho; avicultura; vitamina D₃

Broilers supplemented with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside from breeders at 46 weeks of age supplemented or not with the same additive

Abstract

This study investigated the effects of supplementation with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$) on performance, carcass yield and cuts, blood biochemical parameters, intestinal histomorphometry, bone health, and gene expression in 42-day-old broilers from breeder hens (aged 21 to 46 weeks) that were either supplemented or not supplemented with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. A total of 1,152 one-day-old male chicks (Ross 308 AP) were distributed in a completely randomized design in a 2×3

factorial arrangement. One factor was the supplementation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ in the diet of breeder hens (0.0 and 100 mg/kg), and the other involved three levels (0.0, 50, and 100 mg/kg) of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ in the diet of broilers until 21 days of age, totaling six treatments with eight replicates of 24 birds per experimental unit. Supplementation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ in breeder hens resulted in broilers with higher hatch weight, greater villus height, larger absorptive area, and a higher villus-to-crypt ratio in the jejunum at 42 days of age. Additionally, these broilers had lower serum calcium concentrations, higher calcium and phosphorus deposition in the tibia, greater tibial breaking strength, and increased expression of calbindin-D28K, interleukin-10, and interleukin-1 β at 42 days when derived from breeders supplemented with 100 mg/kg of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Moreover, the inclusion of 100 mg/kg of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ in the broiler diet improved weight gain and immune response at 42 days of age. It is concluded that supplementation with 100 mg/kg of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ in breeder diets is recommended to enhance chick hatch weight and improve bone and intestinal health in broilers at 42 days, while 100 mg/kg in the broiler diet improves weight gain at this age.

Keywords: Bone; immune response; performance; poultry; vitamin D_3

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de linhagens de frangos de corte tem como objetivo alcançar um peso ideal em um período relativamente curto [1–3]. Isso implica em uma demanda significativa por nutrientes essenciais para sustentar essa taxa de crescimento, como vitaminas, minerais, proteínas e energia [4–6]. Nesse contexto, a inclusão de vitamina D_3 na dieta dessas aves desempenha um papel fundamental no metabolismo ósseo, sendo essencial para a regulação do cálcio e do fósforo, que estão diretamente ligados à formação e manutenção da estrutura óssea [7,8]. Além disso, a suplementação com vitamina D_3 desempenha funções importantes no sistema imunológico, na regulação do crescimento celular e na modulação dos processos inflamatórios [9–11].

Atualmente, o mercado oferece uma variedade de opções de vitamina D_3 para atender às necessidades da avicultura [12]. A escolha da forma de vitamina D_3 pode depender de diversos fatores, como custo, eficácia e formulação específica para suprir as necessidades das aves em diferentes fases de crescimento [13,14]. No entanto, é essencial garantir que a forma utilizada seja adequada e administrada nas doses corretas para evitar deficiências ou excessos, que podem causar problemas de saúde e comprometer o desempenho produtivo [5,15,16].

Uma das formas mais utilizadas é o colecalciferol, que representa a forma não hidroxilada da vitamina D_3 [11,17,18]. Essa forma é facilmente metabolizada pelo organismo das aves, sendo convertida em vários metabólitos ativos, como 25-hidroxicolecalciferol, 1α -hidroxicolecalciferol e 1,25-dihidroxicolecalciferol [19–21]. Esses metabólitos desempenham papéis específicos na regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo, contribuindo para a saúde óssea e o funcionamento adequado do sistema imunológico [22–24].

Dentre os metabólitos mencionados, o 1,25-dihidroxicolecalciferol se destaca como a forma ativa da vitamina D₃, sendo uma alternativa promissora [16,25]. No organismo das aves, essa substância é sintetizada nos rins a partir do seu precursor, a 25-hidroxivitamina D, e desempenha um papel crucial na regulação da absorção de cálcio no intestino [26,27].

Além da produção endógena, o 1,25-dihidroxicolecalciferol pode ser fornecido diretamente na dieta por meio de fontes naturais, como o *Solanum glaucophyllum*, onde está presente com uma ligação de glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) [28,29]. Essa forma glicosilada permite uma liberação prolongada no intestino das aves, sem a necessidade de metabolização prévia pelo fígado e rins [28–30]. Essa liberação ocorre graças a enzimas intestinais que hidrolisam a ligação com a glicose, convertendo o 1,25(OH)₂D₃-G em sua forma ativa livre [28,29,31,32]. Esse processo é essencial para a absorção eficiente de cálcio e fósforo, além de garantir o funcionamento adequado do 1,25-dihidroxicolecalciferol no organismo das aves [9,33].

Estudos recentes destacaram que a inclusão de 1,25(OH)₂D₃-G resultou em aumento substancial nos transportadores de cálcio [30,34]. Essa estimulação favoreceu uma absorção aprimorada de cálcio, especialmente no intestino proximal, notadamente no jejuno, resultando em melhorias significativas no desempenho e na mineralização óssea dos frangos de corte [4,18,35]. Além disso, outras pesquisas identificaram melhorias nas respostas imunológicas, evidenciadas pelo aumento da expressão gênica relacionada a interleucinas, bem como pelos níveis de anticorpos e imunoglobulinas intestinais [31,36]. Esses achados sugerem um possível efeito imunomodulador associado à inclusão de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das aves, contribuindo para a melhora da saúde e do desempenho [23,37,38].

No entanto, é fundamental destacar que a quantidade ideal de 1,25(OH)₂D₃-G a ser incluída nas dietas tanto de frangos de corte quanto de matrizes ainda não está completamente estabelecida [4,29]. Diversos estudos indicam que fatores como fase de crescimento, biodisponibilidade da fonte utilizada e interação com outros nutrientes essenciais, especialmente cálcio e fósforo, precisam ser mais aprofundados para uma compreensão mais precisa dos mecanismos de ação do 1,25(OH)₂D₃-G [29,31,39]. Além disso, a ação de 1,25(OH)₂D₃-G pode diferir entre matrizes e suas progênies, tornando essencial a realização de mais pesquisas para determinar a dosagem mais eficaz para otimizar a formação óssea, a absorção de minerais e a saúde geral das aves, sem comprometer a segurança e o equilíbrio nutricional da dieta [26,27,40,41,42].

Portanto, este estudo parte da hipótese de que a suplementação de matrizes com esse metabólito resulta em frangos de corte com ossos mais fortes ao nascimento, favorecendo um crescimento alinhado ao desempenho produtivo e aprimorando a resposta imunológica das aves. Com base nessa premissa, o objetivo foi investigar os efeitos da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G sobre o desempenho, rendimento de carcaça, cortes, parâmetros bioquímicos sanguíneos, histomorfometria intestinal, composição da tíbia, resistência à quebra da tíbia, lesões de discondroplasia tibial e expressão gênica em frangos de corte aos 42 dias de idade, provenientes de matrizes com 46 semanas de idade suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aves, alojamento e delineamento experimental

Dois galpões de matrizes (G1 e G2) foram estabelecidos no município de Pato Branco, Paraná, Brasil, com o objetivo de alojar 8.000 matrizes AP95 (Aviagen) a partir das 21 semanas de idade. Os galpões eram idênticos em termos de características físicas, e as práticas de manejo foram padronizadas para ambos.

Cada galpão possuía 175 m de comprimento por 13 m de largura, sendo construído com estrutura metálica e cobertura de Brasilit, com pé-direito de três metros sem isolamento térmico. Para ventilação, os galpões eram equipados com telas anti-pássaros e cortinas brancas, além de ventiladores para manter a pressão positiva. Os ninhos eram mecânicos, enquanto o sistema de alimentação consistia em comedouros automáticos, específicos para matrizes, e os bebedouros eram do tipo pendular.

As matrizes alojadas nos galpões G1 e G2 receberam dietas idênticas, formuladas com milho e farelo de soja, atendendo às exigências nutricionais ao longo do período produtivo (21 a 46 semanas de idade). No entanto, as matrizes do G1 foram suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G na ração farelada, na dosagem de 100 mg/kg a partir das 21 semanas de idade, enquanto as matrizes do G2 receberam a mesma dieta, porém sem suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G.

Aos atingirem 46 semanas de idade, os ovos de cada galpão foram coletados separadamente, identificados, selecionados e higienizados. Em seguida, foram transportados para o incubatório, onde foram incubados em incubadoras Jamesway Platinum Series por 18 dias, mantidos a 37,5°C e 60% de umidade relativa. Após esse período, os ovos foram transferidos para os nascedouros, onde permaneceram até a eclosão, sob temperatura de 37,2°C e umidade relativa de 65%.

Após a eclosão, os pintinhos foram sexados e vacinados contra Doença de Marek, Bouda Aviária, Gumboro e Bronquite Infecciosa. Posteriormente, foram identificados de acordo com a origem das matrizes, considerando a suplementação ou não de 1,25(OH)₂D₃-G, e enviados para o Centro de Pesquisas Avícolas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná -UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

Um total de 1.152 pintos machos de um dia da linhagem Ross 308 AP95, foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 x 3. Um dos fatores foi a origem dos frangos de corte, provenientes de matrizes suplementadas com ou sem 1,25(OH)₂D₃-G (0,0 e 100 mg/kg). Enquanto o outro fator, foi a suplementação de três níveis de inclusão (0,0; 50 e 100 mg/kg) de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta dos frangos de corte até os 21 dias de idade, totalizando 6 tratamentos, 8 repetições e 24 aves por unidade experimental. Aos 42 dias de idade o desempenho, rendimento de carcaça, cortes, parâmetros bioquímicos sanguíneos, histomorfometria intestinal, saúde óssea e expressão gênica foram analisados nos frangos de corte.

Os frangos de corte foram alojados em um galpão experimental de 35 m de comprimento por 13 m de largura, dividido em seções contendo múltiplas unidades experimentais. Cada unidade experimental possuía 1,96 m² e estava equipada com comedouro tubular, bebedouros tipo *nipple* e piso de concreto. O controle ambiental foi realizado por meio de um painel de controle Smaai IV, que operava um forno de aquecimento a pellets, quatro exaustores e painéis evaporativos de resfriamento. O programa de iluminação seguiu as recomendações do manual da linhagem. A renovação do ar e a refrigeração do ambiente foram asseguradas por exaustores e painéis evaporativos. As temperaturas média, mínima e máxima, assim como a umidade relativa do ar, foram monitoradas diariamente, sendo mantidas dentro da faixa de conforto térmico recomendada para cada fase de crescimento.

Dieta e manejo alimentar

As dietas experimentais (Tabela 1) foram isonutritivas e isocalóricas, baseadas em milho e farelo de soja, seguindo as recomendações nutricionais de [43]. O uso de 1,25(OH)₂D₃-G substituiu o material inerte na ração. O 1,25(OH)₂D₃-G foi fornecido apenas até os 21 dias de idade. Após esse período, os frangos de corte receberam as mesmas dietas de crescimento e terminação, sem a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G. Durante todo o período experimental (1 a 42 dias) as aves tiveram acesso *ad libitum* a água e ração.

Tabela 3. Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Terminação
Milho (7,88%)	504,76	525,03	589,79	645,33
Farelo de soja (46%)	423,88	402,13	333,75	286,41
Óleo de soja degomado	29,70	33,66	39,07	36,54
Fosfato bicálcico	17,86	16,37	15,04	11,34
Calcário calcítico	9,39	8,64	8,62	7,16
Sal comum	4,02	3,68	3,36	3,37
Bicarbonato de sódio	1,00	1,50	2,00	2,00
Lisina sulfato (60%)	1,70	1,75		
Lisina sulfato (54,7%)			2,20	2,43
DL-Metionina (99%)	3,27	3,09	2,58	2,23
L-Treonina (99%)	0,47	0,42	0,31	0,24
Cloreto de colina (60%)	0,50	0,50	0,50	0,45
Adsorvente ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix vitamínico ²	1,30	1,00	1,00	1,00
Premix mineral ³	0,50	0,50	0,50	0,50
Coccidiostático ⁴	0,55	0,55	0,20	
Enramicina ⁵		0,08	0,08	
Inerte (caulim) ⁶	0,10	0,10		
Composição nutricional calculada				
Energia metab. (kcal kg ⁻¹)	3000	3050	3150	3200
Proteína bruta (g kg ⁻¹)	240,471	231,848	205,060	187,327
Lisina digestível (g kg ⁻¹)	13,000	12,50	11,000	10,000
Met. + Cist. digestível (g kg ⁻¹)	9,620	9,250	8,140	7,400
Treonina digestível (g kg ⁻¹)	8,580	8,250	7,260	6,600
Valina digestível (g kg ⁻¹)	10,000	9,630	8,470	7,700
Trp. digestível (g kg ⁻¹)	2,804	2,688	2,323	2,077
Arginina digestível (g kg ⁻¹)	15,196	14,573	12,619	11,302
Cálcio (g kg ⁻¹)	9,500	8,780	8,220	6,610
Fósforo disponível (g kg ⁻¹)	4,500	4,190	3,840	3,090

Sódio (g kg ⁻¹)	2,000	2,000	2,000	2,000
Potássio (g kg ⁻¹)	9,372	9,039	7,995	7,306

¹Adisorvente – bentonita. ²Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta na ração pré-inicial: Vitamina A (min) 14.300 U.I.; Vitamina D₃ (min) 5.200 U.I.; Vitamina E (min) 71,50 U.I.; Vitamina K₃ (min) 3,90 mg; Vitamina B₁ (min) 2,99 0mg; Vitamina B₂ (min) 9,10 mg; Ácido pantotênico (min) 15,60 mg; Vitamina B₆ (min) 5,20 mg; Vitamina B₁₂ (min) 32,50 mg; Ácido nicotínico (min) 78,00 mg; Ácido fólico (min) 2,60 mg; Biotina (min) 0,33 mg; Selênio (min) 0,39 mg. Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta nas dietas inicial, crescimento e terminação: Vitamina A 11.000 UI; Vitamina D₃ 4.000 UI; Vitamina E 55 UI; Vitamina K₃ 3,00 mg; Tiamina (B₁) 2,30 mg; Riboflavina (B₂) 7,00 mg; Piridoxina (B₆) 4,00 mg; Cianocobalamina (B₁₂) 25,00 mg; Ácido pantotênico (B₅) 12,00 mg; Niacina (B₃) 60,00mg. Ácido fólico (B₉) 2,00 mg. Biotina (B₇) 0,25 mg. Selênio 0,30 g. ³Suplemento mineral, composição por kg de dieta: Ferro (min) 50g; Cobre (min) 10g; Manganês (min) 65g; Zinco (min) 65g; Iodo (min) 1000 mg. ⁴Anticoccidiano: de 1 a 21 dias de idade utilizado salinomicina 12% (Coxistac 12%) e de 22 a 35 dias de idade salinomicina 24% (Salinocox 24%). ⁵Enramicina 8% (Enradin 8%). ⁶Inerte a base de caulim, sendo a inclusão do 1,25(OH)₂D₃-G em função da substituição de peso por peso pelo inerte.

Tratamentos e descrição do produto

Os tratamentos avaliados para o crescimento dos frangos de corte, provenientes de matrizes não suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G, consistiram na inclusão de 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na ração. Para os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, os tratamentos consistiram na adição de 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G. A vitamina utilizada neste estudo (1,25(OH)₂D₃-G) é proveniente do Panbonis® 10, produzido a partir de *Solanum glaucophyllum* na forma de pó, padronizado com amido de trigo pré-gelatinizado e farelo de trigo. Sua composição analítica inclui 1,25(OH)₂D₃-G (mínimo de 10 ppm), umidade (máximo de 14%), proteína bruta (14-18%), fibra bruta (5,25-8,75%), gordura bruta (3-6%), cinza bruta (3-6%), sódio (0,0-0,7%), lisina (0,6-0,9%) e metionina (0,2-0,4%).

Desempenho, rendimento de carcaça e cortes

As aves e a ração foram pesadas no início do período experimental e aos 42 dias de idade para determinar o consumo médio de ração, o ganho de peso corporal e a conversão alimentar. A mortalidade foi registrada diariamente para ajustar o consumo de ração e a conversão alimentar [44].

Aos 42 dias de idade, três aves por unidade experimental, foram selecionadas aleatoriamente, pesadas, identificadas e eutanasiadas, por eletronarcore seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração. As carcaças foram inicialmente pesadas, em seguida, foram resfriadas em água e gelo por 60 minutos e submetidas a um período de gotejamento de 10 minutos, para remover o excesso de água. Posteriormente, as carcaças resfriadas foram pesadas para calcular o rendimento da carcaça fria. Em seguida, foram espostejadas, separando-se as pernas (coxa e sobrecoxa), asas, filé de peito e sassami, sendo cada corte pesado individualmente.

O rendimento da carcaça foi calculado a partir do peso da carcaça em relação ao peso vivo da ave. Já o rendimento dos cortes foi determinado com base no peso dos cortes em relação ao peso da carcaça fria. O fígado e a gordura abdominal (constituída pelo tecido adiposo presente ao redor da cloaca, moela, pro ventrículo e dos músculos abdominais adjacentes) foram separados e pesados para determinar o peso relativo dos mesmos em função do peso vivo da ave.

Histomorfometria intestinal

Aos 42 dias de idade, duas aves por unidade experimental foi eutanasiada por deslocamento cervical para retirada do aparelho digestório para avaliação da morfometria intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta, área de absorção e relação vilo: cripta). O intestino delgado foi exposto e o jejuno foi separado para a amostragem. No jejuno, o segmento foi da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Coletou-se um fragmento de 2 cm do jejuno, a 5 cm antes do divertículo de Meckel. Esse fragmento foi fixado em solução de formalina tamponada (10%), desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em parafina. Em seguida, cortes semisseriados de 5 µm de cada segmento foram dispostos em lâminas de vidro e corados utilizando a técnica de hematoxilina-eosina, conforme descrito por [45].

As medições foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE 4.1. Em cada lâmina, foram registrados o comprimento e a largura dos vilos, assim como a profundidade e a largura das criptas. Essas medidas morfométricas foram utilizadas para calcular a área da superfície de absorção da mucosa intestinal, seguindo a fórmula descrita por [46]. Com os resultados de altura de vilo e profundidade de cripta foi calculada a relação vilo:cripta.

Parâmetros bioquímicos sanguíneos

Aos 42 dias de idade, dois frangos de corte próximos ao peso médio de cada repetição foram selecionados aleatoriamente para a coleta de sangue (4 mL) por punção da veia ulnar, enquanto as aves estavam posicionadas em decúbito lateral. As amostras foram analisadas para cálcio, fósforo, lactato desidrogenase, creatina fosfoquinase e fosfatase alcalina. Para a coleta, foram utilizados tubos a vácuo específicos com ativador de coágulo e capacidade de 5 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil), além de adaptadores e agulhas de 25 x 0,8 mm (Labor Import, Shandong Weigao, China). Após a coleta, as amostras foram mantidas em posição horizontal por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas (K14-4000, Kasvi, Paraná, Brasil) a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a separação do soro, as amostras foram devidamente identificadas, transferidas para microtubos de 2 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) e armazenadas em um freezer a -20°C até o momento da análise [47].

Para as leituras, as amostras foram descongeladas sob refrigeração a 4°C e mantidas no refrigerador por no máximo 8 horas. Antes da análise, foram centrifugadas em uma microcentrífuga (Eppendorf®, modelo Minispin®, Hamburgo, Alemanha) a 1050 g por 10 minutos à temperatura ambiente para remoção de eventuais traços de fibrina. Os parâmetros bioquímicos foram mensurados utilizando um analisador bioquímico automático com espectrofotometria, especificamente o Flexor EL200 (marca Elitech®, modelo Flexor EL200, Puteaux, França). A análise foi conduzida com reagentes, calibradores (Elical II) e padrões de controle (Elitrol I) da marca Elitech®.

Resistencia tibial e sua composição

A tíbia direita dos frangos de corte eutanasiados aos 42 dias de idade foi utilizada para determinar a matéria seca em estufa com circulação de ar (105°C). Após esse processo, as tíbias foram calcinadas por 8 horas em um forno mufla a 600°C para obter a matéria mineral (cinzas). Os teores de cálcio e fósforo no osso foram determinados utilizando a metodologia descrita por [48]. A concentração de cálcio foi medida por espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS), e o fósforo (P) foi medido por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS).

A tíbia esquerda foi utilizada para determinar a resistência óssea utilizando o analisador de textura Brookfield CT3. Este equipamento possui uma base que suporta as áreas epifisárias do osso, aplicando uma força de 5 mm/s com uma carga de 200 kgf na região central do osso (diáfise). Os resultados foram expressos em quilograma-força (kgf) [49].

Discondroplasia tibial

Aos 42 dias de idade, após a avaliação da resistência óssea, a tíbia esquerda foi utilizada para avaliar os graus de discondroplasia tibial, seguindo o método descrito por [50]. Foi feito um corte transversal na parte superior da tíbia para expor a porção central do osso, a fim de avaliar os escores das lesões de acordo com o grau de cartilagem:

- 0: Cartilagem normal, estreita e com pequenas irregularidades;
- 1: Cartilagem espessada ou com irregularidades consideráveis;
- 2: Cartilagem espessada, com evidência de cartilagem pré-hipertrofica que não está calcificada e não foi invadida por vasos da metáfise, irregularidades profundas dessa cartilagem são aparentes;
- 3: Grande massa de cartilagem na extremidade proximal da tíbia.

Expressão gênica

Aos 42 dias de idade, uma ave por unidade experimental recebeu estímulo através da administração intraperitoneal de 1 mg de LPS (lipopolissacarídeos de *E. coli*, Sigma) por peso corporal. Após 4 horas, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, imediatamente, um fragmento do jejuno foi coletado e imerso na solução estabilizadora RNAlater™ (Invitrogen, EUA), que foi posteriormente armazenada em um freezer a -20°C até a extração de RNA.

O RNA total foi extraído utilizando o *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen GmbH, Germany). Aproximadamente 70 mg de intestino de frango foi pesado, triturado e adicionado em microtubo, livre de DNase e RNase, contendo 500 µL de Trizol. As amostras foram homogeneizadas (vórtex), incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 100 µL de clorofórmio foi adicionado, seguido de homogeneização manual por 15 segundos. Após isso, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12.000 × g, a 4°C.

A fase aquosa foi coletada em novo tubo, e adicionado 250 µl de isopropanol, seguido por incubação por 10 minutos (temperatura ambiente) com homogeneização manual e centrifugação por 15 minutos a 12000 ×g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a 7500 ×g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado para a secagem do *pellet*, por 15 minutos, e então ressuspensas em água ultrapura livre de DNase e RNase e incubadas a 60°C por 15 minutos.

A concentração de RNA para as interleucinas (IL-1β e IL-10), calbindina-D28K (CALB-D28K) e β-actina (gene para controle endógeno) foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA), no comprimento de onda de 260/280 nm, e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Safe™ DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) e visualizada em aparelho transiluminador com luz ultravioleta.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com as normas do fabricante, considerando 1 µg de RNA e volume final de 20 µL. Para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, cada amostra foi tratada com 2 µL de *gDNA Wipeout Buffer* (Qiagen GmbH, Germany) e incubada a 45°C por 2 min. Após remoção do DNA genômico, foi adicionado 4 µL *Quantiscript RT Buffer*, 1 µL *RT Primer Mix Reverse Transcription Mix* e 1 µL *Quantiscript Reverse Transcriptase*. A reação de transcriptase reversa foi incubada por 15 min a 42°C, seguida de 95°C por 3 min, sendo imediatamente colocada no gelo. As amostras foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Os *primers*/oligonucleotídeos utilizados nas reações foram obtidos a partir de trabalhos publicados de *Gallus gallus* (Tabela 2). As sequências dos *primers* foram alinhadas utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O gene da β-actina foi considerada como gene de referência/*housekeeping*, e sua estabilidade entre os tratamentos foi avaliada utilizando o programa *Statistica® 7.0*.

Tabela 2. Genes e sequências de primers.

Gene	Sequência de primers (5'→3')	Tamanho do amplicon (bp)	Referências
β-actina	F: TTCTTTTGGCGCTTGACTCA R: GCGTTCGCTCCAACATGTT	88	Proszkowiec-Weglarz <i>et al.</i> (2019)
CALB-D28K	F: TTGGCACTGAAATCCCACTGAA R: CATGCCAAGACCAAGGCTGA	116	NM_205513.2
IL-1β	F: GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG R: TGTCGATGTCCCGCATGA	80	NM_204524.2
IL-10	F: CATGCTGCTGGGCCTGAA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	94	NM_001004414.4

Nota: CALB-D28K: Calbindina D28K; IL-1β: Interleucina 1 beta; IL-10: Interleucina 10.

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada *primer*, foi realizado diluições seriadas do *pool* de amostras de cDNA contendo todos os tratamentos, utilizando diferentes concentrações dos iniciadores. Para β -actina, CALB-D28K e IL-10 foi considerado 200 ng de cDNA e 400 nM de *primer*, e para IL-1 β , 200 ng cDNA e 600 nM de *primer*.

As análises de qRT-PCR foram conduzidas em Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germany), utilizando o *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* (Qiagen GmbH, Germany) em duplicatas. O volume total da reação foi de 20 μ l. As condições de amplificação foram: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 seg, e 60°C por 10 seg. A curva de dissociação (*melt curve*) dos produtos da reação foi obtida, para determinar a especificidade das reações.

Os dados de expressão gênica relativa foram registrados como valores de Ct (cycle threshold) e foram normalizados utilizando a média dos valores de Ct obtidos para o gene de referência em cada amostra, para cada tratamento e para cada gene alvo, conforme recomendado por [51]. O método $2^{-\Delta Ct}$ foi usado para quantificação relativa da expressão gênica (expressa como unidades arbitrárias, AU).

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade residual utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de Levene, ambos realizados por meio do procedimento Univariate. Para os dados com distribuição normal, foi realizada uma análise de variância de dois fatores (ANOVA) para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G em matrizes e frangos de corte, bem como as possíveis interações entre esses fatores. Quando efeitos significativos foram detectados, as médias dos tratamentos para as matrizes foram comparadas utilizando o teste F, enquanto as médias dos tratamentos para os frangos de corte foram comparadas utilizando o teste de Student-Newman-Keuls. Essas análises foram conduzidas utilizando o procedimento GLM.

Para os dados que não apresentaram distribuição normal (discondroplasia tibial), foram aplicados testes não paramétricos. Na avaliação da incidência de lesões, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G em matrizes e frangos de corte, seguido pelo teste de Dunn para comparações das médias, utilizando o procedimento N1PARWAY. Para avaliar as interações entre matrizes e frangos de corte para dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Friedman por meio do procedimento FREQ. O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G em matrizes e frangos de corte nos diferentes graus de lesão tibial, sendo os testes realizados com o procedimento FREQ. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SAS, com nível de significância de 5%, e 10% quando necessário [52].

RESULTADOS

Desempenho

Os parâmetros de desempenho dos frangos de corte aos 42 dias de idade não mostraram interação ($P > 0,05$) entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G. No entanto,

matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G resultaram em pintos mais pesados ($P < 0,001$) ao nascimento e maior consumo de ração aos 42 dias de idade ($P < 0,031$). Os frangos de corte suplementados com 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante o crescimento apresentaram maior consumo de ração ($P < 0,009$) e maior ganho de peso ($P < 0,012$) em comparação com aqueles que não foram suplementados com a vitamina (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	PIM (g)	CRM (g)	GPM (g)	CA (g/g)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	42,97 ^b	4644 ^b	3147	1,479
100	43,78 ^a	4688 ^a	3168	1,476
Vit D ₃ Frangos				
0,0	43,31	4637 ^B	3121 ^B	1,480
50	43,43	4621 ^B	3150 ^{AB}	1,477
100	43,33	4710 ^A	3202 ^A	1,476
¹ EPM	0,53	85,31	63,50	0,02
<i>P</i> valor				
Vit D ₃ Matrizes	0,001	0,031	0,341	0,595
Vit D ₃ Frangos	0,859	0,009	0,012	0,767
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,911	0,067	0,441	0,363

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). PIM: Peso inicial médio; CRM Consumo de ração médio; GPM: Ganho de peso médio; CA: Conversão alimentar; EPM: Erro padrão da média; Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Rendimento de carcaça, cortes e órgãos

O rendimento de carcaça, cortes e peso relativo dos órgãos de frangos de corte aos 42 dias de idade não mostraram interação ($P > 0,05$) entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 4). No entanto, a suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes resultou em frangos de corte com menor rendimento de perna ($P < 0,010$) e menor peso relativo do fígado ($P < 0,002$) aos 42 dias de idade.

Tabela 4. Rendimento de carcaça, cortes e peso relativo de órgãos de frangos de corte processados aos 42 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	RC (%)	RP (%)	RP (%)	FP (%)	RA (%)	PRG (%)	PRF (%)
Vit D ₃ Matrizes							
0,0	74,37	32,28 ^a	26,79	5,46	8,82	1,72 ^a	1,04
100	74,77	31,63 ^b	27,31	5,41	8,88	1,60 ^b	1,03
Vit D ₃ Frangos							
0,0	74,40	31,75	26,88	5,44	8,85	1,66	1,07
50	74,60	32,18	27,13	5,48	8,95	1,65	1,04
100	74,68	31,95	27,13	5,39	8,76	1,68	0,99
¹ EPM	1,51	1,50	1,73	0,50	0,64	0,18	0,34
<i>P</i> valor							
Vit D ₃ Matrizes	0,122	0,010	0,076	0,568	0,553	0,002	0,952
Vit D ₃ Frangos	0,670	0,380	0,709	0,698	0,400	0,779	0,512
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,988	0,601	0,367	0,577	0,090	0,204	0,782

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). RC: Rendimento de carcaça; RP: Rendimento de pernas (coxa e sobrecoxa); BY: Rendimento de peito; FP: Filé de peito (sassami); RA: Rendimento de asas; PGA: Peso relativo de gordura abdominal; PRF: Peso relativo do fígado; EPM: Erro padrão da média; Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G; ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Histomorfometria intestinal

A histomorfometria do jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade não mostrou interação ($P > 0,05$) entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 5). No entanto, os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram maior altura de vilos ($P < 0,001$), área de absorção ($P < 0,001$) e maior relação vilos:cripta ($P < 0,001$) em comparação aos frangos de corte de matrizes não suplementadas. Além disso, frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante a fase de crescimento apresentaram maior altura de vilos ($P < 0,009$) e maior relação vilos:cripta ($P < 0,020$) em comparação aos demais tratamentos.

Tabela 5. Histomorfometria do jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	AV (µm)	PC (µm)	AA (µm ²)	V:C (µm)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	1117,54 ^b	150,41	11,70 ^b	7,43 ^b
100	1496,67 ^a	150,84	15,23 ^a	9,93 ^a
Vit D ₃ Frangos				
0,0	1334,45 ^{AB}	153,96	13,63	8,70 ^{AB}
50	1220,55 ^B	147,90	12,91	8,22 ^B
100	1366,31 ^A	150,02	13,85	9,13 ^A
¹ EPM	133,88	7,78	1,45	0,89
P valor				
Vit D ₃ Matrizes	0,001	0,847	0,001	0,001
Vit D ₃ Frangos	0,009	0,094	0,171	0,020
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,856	0,163	0,491	0,512

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). AV: Altura do vilos; PC: Profundidade da cripta; V:C: Relação vilos:cripta. ¹EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem segundo o teste F com significância de 5%; ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna diferem segundo o teste de Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Perfil bioquímico sanguíneo

Os resultados do perfil bioquímico sanguíneo de frangos de corte aos 42 dias de idade não mostraram interação significativa ($P > 0,05$) entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 6). No entanto, matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G resultaram em frangos de corte com menor concentração de cálcio ($P < 0,028$) aos 42 dias de idade.

Tabela 6. Concentrações de cálcio e fósforo, e atividade enzimática sérica de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	LDH (U/L)	CPK (U/L)	FA (U/L)
Vit D ₃ Matrizes					
0,0	11,94 ^a	7,21	1434	24352	8492
100	11,05 ^b	6,92	1365	20864	7305
Vit D ₃ Frangos					
0,0	11,52	6,96	1412	24237	7797
50	11,41	7,24	1460	22381	7505
100	11,37	6,96	1321	20858	8288
¹ EPM	1,38	0,57	356	7526	3408
P valor					
Vit D ₃ Matrizes	0,028	0,097	0,526	0,129	0,236
Vit D ₃ Frangos	0,845	0,291	0,553	0,449	0,852

Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,069	0,264	0,737	0,468	0,104
--	-------	-------	-------	-------	-------

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). Ca: Cálcio; P: Fósforo; LDH: Lactato desidrogenase; CPK: Creatina fosfoquinase; FA Fosfatase alcalina. ¹EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem segundo o teste F com significância de 5%.

Resistencia tibial e sua composição

A resistência à quebra da tibia em frangos de corte aos 42 dias de idade não apresentou interação significativa ($P > 0,05$) entre as matrizes e os frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 7). No entanto, a concentração de fósforo na tibia dos frangos de corte aos 42 dias de idade mostrou uma interação significativa ($P < 0,008$). Além disso, a suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes resultou em maiores concentrações de cálcio ($P < 0,002$) e fósforo ($P < 0,001$) na tibia dos frangos de corte aos 42 dias de idade, o que contribuiu para uma maior resistência à quebra da tibia ($P < 0,026$). Adicionalmente, os frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante o crescimento apresentaram maior teor de matéria seca na tibia ($P < 0,018$) em comparação com aqueles que receberam outros níveis de suplementação da vitamina.

A análise de interação entre matrizes e frangos suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G revelou que os frangos de corte provenientes de matrizes não suplementadas apresentaram maiores concentrações de fósforo na tibia quando suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G ($P < 0,012$). No entanto, ao comparar a origem dos frangos de corte, aqueles provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram maiores concentrações de fósforo na tibia quando suplementados com 0,0 e 50 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G ($P < 0,040$ e $P < 0,001$, respectivamente), em comparação com frangos de matrizes não suplementadas recebendo as mesmas doses (Figura 1).

Tabela 7. Resistência à fratura e composição bromatológica da tibia expressa em matéria seca de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	RQT (kgf)	MS (%)	Ca (%)	P (%)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	38,10 ^b	49,00 ^a	17,52 ^b	8,37 ^b
100	40,86 ^a	48,01 ^b	18,55 ^a	9,27 ^a
Vit D ₃ Frangos				
0,0	40,51	48,17 ^{AB}	18,10	8,79
50	38,27	47,93 ^B	18,01	8,65
100	39,66	49,42 ^A	18,00	9,02
¹ EPM	4,15	1,21	1,10	0,73
<i>P</i> valor				
Vit D ₃ Matrizes	0,026	0,006	0,002	0,001
Vit D ₃ Frangos	0,313	0,018	0,964	0,358

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). MS: Matéria seca; Ca: Cálcio; P: Fósforo; RQT: Resistência a quebra da tíbia; EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

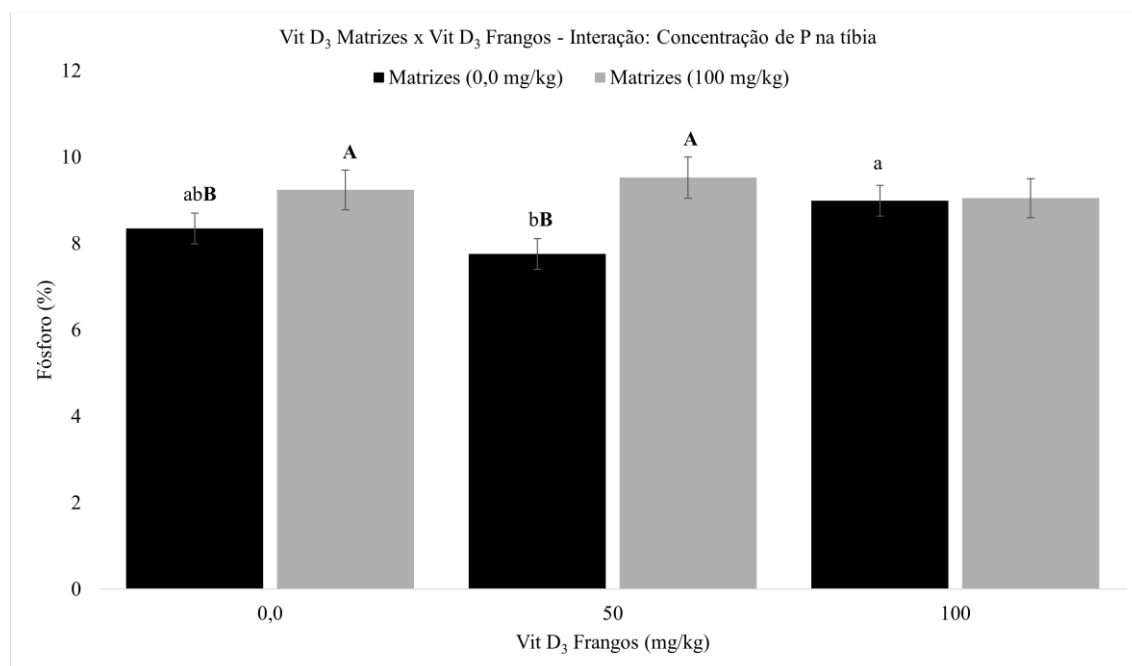


Fig. 1. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na concentração de fósforo na tíbia dos frangos aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Os frangos de corte suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G provenientes de matrizes não suplementadas com 100 mg/kg do aditivo ($P < 0,012$). ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 0,0 e 50 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo ($P < 0,040$ e $P < 0,001$, respectivamente).

Discondroplasia tibial

Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi identificada nas lesões de discondroplasia tibial em frangos de corte aos 42 dias de idade (Tabela 8).

Tabela 8. Discondroplasia tibial em frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Grau das lesões tibiais				
	Escore médio	Isento (%)	Leve (%)	Moderado (%)	Severo (%)
Vit D ₃ Matrizes					
0,0	0,63	50,70	39,44	5,63	4,23
100	0,49	58,57	35,71	4,29	1,43
Vit D ₃ Frangos					
0,0	0,64	48,94	40,43	8,51	2,12
50	0,47	57,45	40,43	0,00	2,12

100	0,57	57,45	31,91	6,38	4,26
<i>P</i> valor					
Vit D ₃ Matrizes	0,218	0,348	0,648	0,712	0,317
Vit D ₃ Frangos	0,502	0,632	0,616	0,141	0,773
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,415	-	-	-	-

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). EPM: Erro padrão da média.

Expressão gênica

A expressão gênica da interleucina 10 em frangos de corte aos 42 dias de idade apresentou interação significativa ($P < 0,05$) entre matrizes e frangos suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G (Tabela 9). Além disso, matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G resultaram em frangos com maiores concentrações de calbindina D28K ($P < 0,045$), interleucina 10 ($P < 0,004$) e interleucina 1 β ($P < 0,021$) aos 42 dias de idade, em comparação com frangos de matrizes não suplementadas. Adicionalmente, frangos suplementados com 50 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante a fase de crescimento apresentaram maiores concentrações de calbindina D28K ($P < 0,025$) e interleucina 10 ($P < 0,001$) tanto nas concentrações de 50 quanto de 100 mg/kg.

A análise da interação entre matrizes e frangos de corte suplementados com 1,25(OH)₂D₃-G revelou que frangos de corte de matrizes não suplementadas apresentaram maiores concentrações de interleucina 10 quando suplementados com 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G ($P < 0,001$) aos 42 dias de idade (Figura 2). Por outro lado, frangos de matrizes suplementadas, quando suplementados com 100 mg/kg, apresentaram maiores concentrações de interleucina 10 ($P < 0,001$).

Tabela 9. Expressão gênica no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Calbindina D28K	Interleucina 10	Interleucina 1 β
Vit D ₃ Matrizes			
0,0	0,372 ^b	1,634 ^b	1,341 ^b
100	0,448 ^a	2,278 ^a	1,685 ^a
Vit D ₃ Frangos			
0,0	0,330 ^B	1,399 ^B	1,271
50	0,463 ^A	2,441 ^A	1,822
100	0,442 ^{AB}	2,021 ^A	1,456
¹ EPM	0,119	0,538	0,854
<i>P</i> valor			
Vit D ₃ Matrizes	0,045	0,004	0,021
Vit D ₃ Frangos	0,025	0,001	0,277
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,492	0,043	0,162

Vit D₃: 1,25(OH)₂D₃-G (1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo). EPM: Erro padrão da média. Matrizes x Frangos - interação: Matrizes suplementadas com 0,0 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G x frangos de corte suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

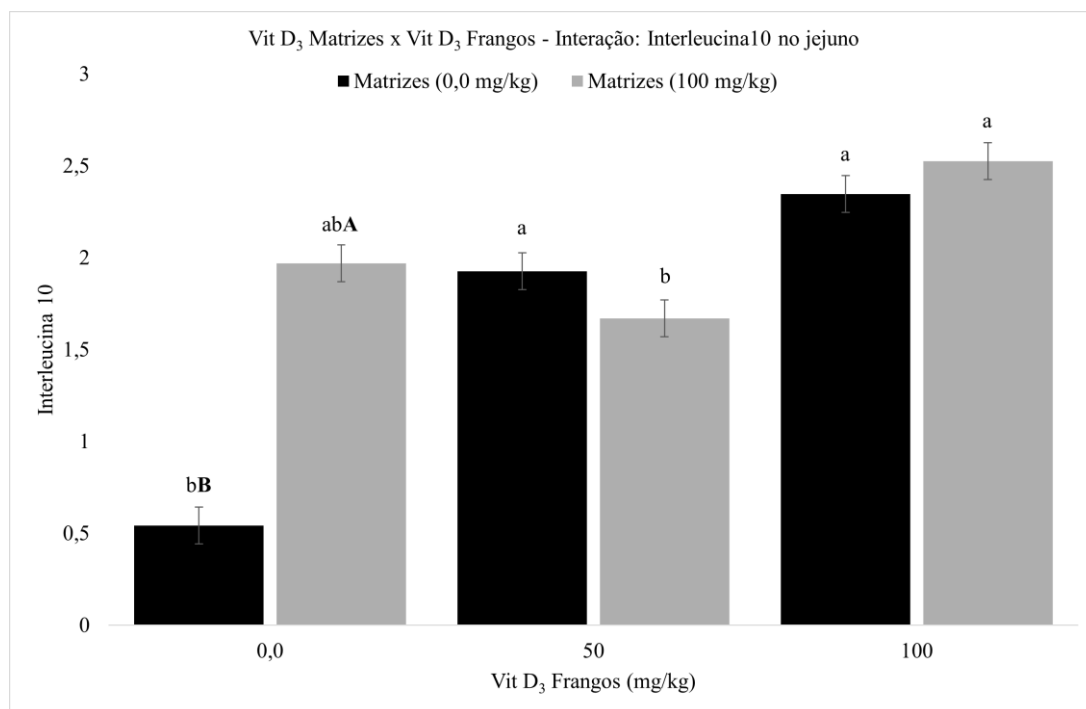


Fig. 2. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na expressão gênica da interleucina-10 no jejuno de frangos aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,001$). Os frangos suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo ($P < 0,001$). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 0,0 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G provenientes de matrizes não suplementadas e suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,001$).

DISCUSSÃO

Os frangos de corte recém-eclodidos mais pesados, provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G, sugerem um efeito positivo dessa forma glicosídica no desenvolvimento embrionário. Essa substância pode ter promovido uma melhor absorção e utilização do cálcio e outros nutrientes essenciais durante o período de formação do ovo [42,53,54]. Esses resultados são consistentes com a pesquisa de [55], que identificou uma associação positiva entre a suplementação de vitamina D₃ ativa na dieta das matrizes e o transporte de nutrientes para o ovo. Isso destaca a importância da dieta das matrizes na promoção da saúde e no desenvolvimento precoce dos frangos de corte [2,13,56]. Outros estudos sugerem que a vitamina D₃ e seus metabólitos são incorporados na gema do ovo e, durante o desenvolvimento embrionário, esses nutrientes são eficientemente absorvidos pelo embrião, aumentando as concentrações de cálcio nos tecidos embrionários, promovendo ossos mais fortes nos pintinhos [36,42,57].

O aumento do ganho de peso dos frangos de corte aos 42 dias de idade sugere que esse resultado não está relacionado à suplementação das matrizes, mas sim à suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante o período de crescimento dos frangos de corte. Isso destaca a complexidade dos

efeitos do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ no metabolismo dos frangos de corte, sugerindo diferentes mecanismos de ação em diferentes estágios de desenvolvimento [4,30,59]. Nesse contexto, os resultados de ganho de peso podem estar correlacionados com os resultados de histomorfometria intestinal do presente estudo.

A inclusão de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das aves resultou em benefícios para a saúde intestinal. Nesse grupo, foi observado um aumento substancial na altura das vilosidades e uma maior relação de vilo:cripta no jejuno em comparação com os frangos de corte não suplementados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. O aumento da altura das vilosidades sugere uma expansão da superfície de absorção intestinal, enquanto a maior relação de vilo:cripta indica um ambiente intestinal mais favorável para a absorção de nutrientes e para a manutenção da integridade da mucosa intestinal [18,60].

O aumento da altura das vilosidades, área de absorção e a relação vilo:cripta no jejuno dos frangos de corte aos 42 dias de idade, quando provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ sugere uma melhoria na morfologia intestinal, indicando uma melhor utilização dos nutrientes [9,33,61,62]. Esses resultados refletem uma adaptação positiva da mucosa intestinal, caracterizada por uma maior integridade estrutural e funcional [63–65].

A diminuição no rendimento das pernas (coxas e sobrecoxas) e do peso do fígado nos frangos de corte aos 42 dias de idade, provenientes de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, sugere uma redistribuição dos nutrientes e uma mudança na alocação de energia no corpo das aves durante o seu crescimento [29]. Em vez de ser direcionada para o desenvolvimento dos tecidos musculares das pernas ou para o crescimento do fígado, parte desses nutrientes pode ter sido redirecionada para outras funções metabólicas ou para apoiar processos biológicos essenciais [5,10,11,66].

A redução nas concentrações de cálcio no sangue, acompanhada do aumento das concentrações de cálcio e fósforo na tíbia dos frangos de corte aos 42 dias de idade, pode ser atribuída à suplementação de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes. Esse efeito sugere que a suplementação influenciou diretamente o desenvolvimento inicial dos frangos de corte, otimizando a disponibilidade de cálcio e fósforo durante as primeiras semanas de vida [1,2,53,67]. Esse fornecimento inicial de minerais pode ter facilitado a absorção e utilização de nutrientes durante o crescimento, resultando em uma redistribuição eficiente dos minerais da corrente sanguínea para os tecidos ósseos [7,30]. Consequentemente, foi observada uma maior mineralização óssea nos frangos de corte, refletida em tíbias mais ricas em cálcio e fósforo, contribuindo para o desenvolvimento e a força estrutural dos ossos [4,5,32,68,69].

A maior resistência à quebra tibial observada em frangos de corte aos 42 dias de idade, de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, pode estar relacionada a uma combinação de fatores, incluindo a melhoria na histomorfometria intestinal e ao aumento na deposição mineral óssea [16,70,71]. A melhoria da integridade intestinal e o aumento da altura das vilosidades, associados a uma maior relação vilo:cripta, indicam uma absorção mais eficiente de cálcio e fósforo durante o crescimento, fornecendo um suprimento adequado desses minerais para o desenvolvimento ósseo [7,23,72]. Esse efeito é particularmente relevante, pois a mineralização óssea depende não apenas da quantidade de

cálcio e fósforo disponíveis, mas também da capacidade do organismo em utilizá-los de forma eficaz [4,10,11,16].

A suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes pode ter criado um ambiente metabólico mais eficiente, com maior disponibilidade de minerais na fase inicial de crescimento dos frangos de corte, promovendo uma deposição óssea fortificada e, conseqüentemente, aumentando a resistência à quebra tibial [10,11,18,59]. Portanto, a combinação da melhora na absorção intestinal e a maior mineralização óssea parece ter efeitos sinérgicos na saúde óssea dos frangos, resultando em tíbias mais fortificadas aos 42 dias de idade, sem comprometer o desempenho das aves [65,71,73, 74,75].

O aumento da expressão de calbindina D28K nos frangos de corte sugere uma maior capacidade de absorção de cálcio, o que pode ter contribuído para uma mineralização óssea mais fortificada [9,31]. Essa melhoria na absorção pode ter ativado mecanismos celulares que resultaram em ossos mais densos e fortes [9,75–77]. A relação entre a expressão de calbindina D28K e a resistência a quebra da tíbia, observada neste estudo sugere uma adaptação funcional que otimiza a utilização de cálcio no desenvolvimento ósseo [69,78]. Assim, os resultados indicam que a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes contribuiu para uma série de adaptações fisiológicas que favoreceram a mineralização óssea, promovendo uma saúde estrutural durante o desenvolvimento dos frangos de corte [7,13].

O aumento da expressão tanto da interleucina 10 quanto da interleucina 1β sugere que a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes pode ter um efeito modulador nas respostas imunológicas dos frangos de corte, equilibrando as respostas inflamatórias e melhorando a saúde geral das aves [1,11]. Esse equilíbrio pode ter implicações significativas para o desenvolvimento dos frangos de corte e resistência a doenças. A interleucina 10, conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, pode ter contribuído para atenuar a inflamação crônica, promovendo um ambiente imunológico mais controlado [18,23,31]. Por outro lado, a interleucina 1β , uma citocina pró-inflamatória, é essencial para a defesa contra patógenos, sugerindo que o aumento da expressão de ambas as citocinas pode ter proporcionado uma resposta imunológica mais fortificada [9,76]. Esse mecanismo regulador é crucial para desenvolver uma resposta rápida e eficiente a desafios infecciosos, particularmente durante as primeiras fases da vida, quando os frangos de corte são mais suscetíveis a doenças [18,79,80].

Além disso, a modulação da resposta imunológica pode ter contribuído para a melhora da saúde intestinal dos frangos, já que a inflamação intestinal crônica pode prejudicar a absorção de nutrientes essenciais [11,18,31]. O equilíbrio observado entre essas interleucinas pode ter ajudado a manter a integridade intestinal, facilitando melhor absorção de nutrientes e minerais, como cálcio e fósforo, que, como discutido anteriormente, podem contribuir para a mineralização óssea e aumento da resistência a fraturas [38,81]. Portanto, os resultados sugerem que a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes não apenas impactou positivamente a mineralização óssea, mas também desempenhou um papel significativo na regulação das respostas imunológicas, promovendo uma saúde geral aprimorada, o que pode ter efeitos benéficos no desempenho e na resistência a doenças durante o desenvolvimento dos frangos de corte [15,16,70].

CONCLUSÃO

A suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes resultou em frangos de corte com maior peso ao nascimento e, aos 42 dias de idade, apresentou melhor histomorfometria intestinal, maior mineralização óssea, maior resistência à quebra tibial e modulação da resposta imunológica, evidenciada pelo aumento na expressão das interleucinas 10 e 1β. Por outro lado, a suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante o crescimento dos frangos de corte resultou em maior ganho de peso, melhora na saúde intestinal e modulação da resposta imunológica, sugerindo que essa dose pode ser eficaz na otimização do desenvolvimento e saúde das aves ao longo do seu crescimento.

REFERÊNCIAS

- [1] Barnkob LL, Argyraki A, Jakobsen J. Naturally enhanced eggs as a source of vitamin D: A review. Trends Food Sci Technol 2020;102:62–70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.018>.
- [2] Fatemi SA, Elliott KEC, Bello A, Durojaye OA, Zhang H-J, Peebles ED. The effects of in ovo injected vitamin D3 sources on the eggshell temperature and early posthatch performance of Ross 708 broilers. Poult Sci 2020;99:1357–62. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.055>.
- [3] Kanaani R, RKianfar, HJAnmohammadi, WKK., MOlyae. Influence of vitamin D3 and lactic acid on performance, egg quality, and hatchability in broiler breeder hens. Animal Production Research 2022;11:67–81.
- [4] Vieites FM, Brusamarello E, Corrêa G da SS, Souza CS, De Oliveira CFS, De Moraes GHK, et al. 1,25-dihidroxicolecalciferol de origem herbal (*Solanum glaucophyllum*) mantém o desempenho e a qualidade óssea de frangos de corte fêmeas durante restrição de cálcio e fósforo. Archivos de Zootecnia 2018;67:414–9. <https://doi.org/10.21071/az.v67i259.3799>.
- [5] Souza CS, Vieites FM, Nunes RV, Brusamarello E, Reis TL, Lima CAR de, et al. Suplemento de 1,25-dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte fêmeas. Research, Society and Development 2020;9:e119973975. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3975>.
- [6] Bassi LS, Moreno FA, Martins CCS, Sens RF, Lozano-Poveda CA, Maiorka A. Effect of 25-hydroxycholecalciferol supplementation with different dietary available phosphorus levels for broilers. Br Poult Sci 2023;1–8. <https://doi.org/10.1080/00071668.2023.2278474>.
- [7] Hodnik JJ, Ježek J, Starič J. A review of vitamin D and its importance to the health of dairy cattle. Journal of Dairy Research 2020;87:84–7. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000424>.
- [8] Akinyemi F, Adewole D. Environmental Stress in Chickens and the Potential Effectiveness of Dietary Vitamin Supplementation. Frontiers in Animal Science 2021;2. <https://doi.org/10.3389/fanim.2021.775311>.
- [9] Aye Cho T-Z, Sadiq MB, Srichana P, Anal AK. Vitamin D3 enhanced intestinal phosphate cotransporter genes in young and growing broilers. Poult Sci 2020;99:2041–7. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.038>.
- [10] Shojadoost B, Behboudi S, Villanueva AI, Brisbin JT, Ashkar AA, Sharif S. Vitamin D3 modulates the function of chicken macrophages. Res Vet Sci 2015;100:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.009>.
- [11] Shojadoost B, Yitbarek A, Alizadeh M, Kulkarni RR, Astill J, Boodhoo N, et al. Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. Poult Sci 2021;100:100930. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.027>.
- [12] Babazadeh D, Razavi SA, Abd El-Ghany WA, F Cotter P. Vitamin D Deficiency in Farm Animals: A Review. Farm Animal Health and Nutrition 2022;1:10–6. <https://doi.org/10.58803/fahn.v1i1.7>.
- [13] Świątkiewicz S, Arczewska-Włosek A, Bederska-Lojewska D, Józefiak D. Efficacy of dietary vitamin D and its metabolites in poultry - review and implications of the recent studies. Worlds Poult Sci J 2017;73:57–68. <https://doi.org/10.1017/S0043933916001057>.
- [14] Sakkas P, Smith S, Hill TR, Kyriazakis I. A reassessment of the vitamin D requirements of modern broiler genotypes. Poult Sci 2019;98:330–40. <https://doi.org/10.3382/ps/pey350>.
- [15] Souza CS, Vieites FM. Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. Archivos de Zootecnia 2014;63:11–24. <https://doi.org/10.21071/az.v63i241.588>.

- [16] Vieites FM, Drosghic LCAB, Souza CS, Lima CAR, Moraes GHK, Nunes RV, et al. 1,25-dihidroxivitamina-D3 sobre as características ósseas de frangos de corte fêmeas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017;69:1285–93. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9371>.
- [17] Yavaş İ, Çenesiz AA, Ceylan N. Effects of Herbal Vitamin D3 and Phytase Supplementation to Broiler Feed on Performance, Bone Development and Serum Parameters of Broilers. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2020. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.479182>.
- [18] Hsiao FS-H, Cheng Y-H, Han J-C, Chang M-H, Yu Y-H. Effect of different vitamin D3 metabolites on intestinal calcium homeostasis-related gene expression in broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2018;47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170015>.
- [19] Prietl B, Treiber G, Pieber T, Amrein K. Vitamin D and Immune Function. *Nutrients* 2013;5:2502–21. <https://doi.org/10.3390/nu5072502>.
- [20] Gil Á, Plaza-Díaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab* 2018;72:87–95. <https://doi.org/10.1159/000486536>.
- [21] Martens P-J, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients* 2020;12:1248. <https://doi.org/10.3390/nu12051248>.
- [22] Schwarz A, Navid F, Sparwasser T, Clausen BE, Schwarz T. 1,25-Dihydroxyvitamin D Exerts Similar Immunosuppressive Effects as UVR but Is Dispensable for Local UVR-Induced Immunosuppression. *Journal of Investigative Dermatology* 2012;132:2762–9. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.238>.
- [23] Kumar R, Brar RS, Banga HS. Hypervitaminosis D3 in broiler chicks: histopathological, immunomodulatory and immunohistochemical approach. *Iran J Vet Res* 2017;18:170–6.
- [24] Geng Y, Ma Q, Wang Z, Guo Y. Dietary vitamin D3 supplementation protects laying hens against lipopolysaccharide-induced immunological stress. *Nutr Metab (Lond)* 2018;15:58. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0293-8>.
- [25] Trautenmüller H, Genova JL, Santos LB de A dos, Leal IF, Santos G de B, Rupolo PE, et al. Partial cholecalciferol replacement with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside in diets for piglets. *Anim Prod Sci* 2022;62:1590–9. <https://doi.org/10.1071/AN21150>.
- [26] Zhang L, Lu L, Li S, Zhang G, Ouyang L, Robinson K, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Induces Avian β -Defensin Gene Expression in Chickens. *PLoS One* 2016;11:e0154546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154546>.
- [27] Castro FL de S, Baião NC, Ecco R, Louzada MJQ, Melo É de F, Saldanha MM, et al. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D3 level on broiler performance and bone quality. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2018;47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170186>.
- [28] Vieites FM, Drosghic LCAB, Souza CS, Vargas Júnior JG, Nunes RV, Moraes GHK de, et al. Características ósseas de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semin Cienc Agrar* 2016;37:381. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p381>.
- [29] Alves O dos S, Calixto LFL, Araujo AHB, Torres-Cordido KAA, Reis TL, Calderano AA. Decreased levels of vitamin D3 and supplementation with 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. *Ciência Rural* 2018;48. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170705>.
- [30] Wu L, Wang X, Lv X, He L, Qu H, Shi C, et al. 1,25-Dihydroxycholecalciferol Improved the Growth Performance and Upregulated the Calcium Transporter Gene Expression Levels in the Small Intestine of Broiler Chickens. *J Poult Sci* 2022;59:0210019. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210019>.
- [31] Nunes RA, Duarte M de S, Campos PHRF, de Oliveira LL, e Silva FF, Kreuz BS, et al. Active vitamin D3-glycoside preserves weight gain and modulates the inflammatory response in broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Anim Feed Sci Technol* 2020;270:114704. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114704>.
- [32] Asnayanti A, Alharbi K, Do ADT, Al-Mitib L, Bühler K, Van der Klis JD, et al. Early 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycosides supplementation: an efficient feeding strategy against bacterial chondronecrosis with osteomyelitis lameness in broilers assessed by using an aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research* 2024;33:100440. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100440>.
- [33] Shao Y, Wen Q, Zhang S, Lu L, Zhang L, Liao X, et al. Dietary supplemental vitamin D enhances phosphorus absorption and utilisation by regulating gene expression of related phosphate transporters in the small intestine of broilers. *British Journal of Nutrition* 2019;121:9–21. <https://doi.org/10.1017/S0007114518002763>.
- [34] Alharbi K, Asnayanti A, Hasan A, Vaught WJ, Buehler K, Van der Klis JD, et al. Investigating the effect of 1,25 dihydroxycholecalciferol-glycosides and phytochemical antioxidants against bacterial chondronecrosis induced by aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research* 2025;34:100507. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100507>.
- [35] Yu Y, Li Q, Zhang H, Wu Y, Zhang R, Yue M, et al. Clostridium butyricum alone or combined with 1, 25-dihydroxyvitamin D improved early-stage broiler health by modulating intestinal flora. *J Appl Microbiol* 2022;132:155–66. <https://doi.org/10.1111/jam.15180>.

- [36] Vazquez JR, Gómez G V., López CC, Cortés AC, Díaz AC, Fernández SRT, et al. Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2018;102. <https://doi.org/10.1111/jpn.12715>.
- [37] Rodriguez-Lecompte JC, Yitbarek A, Cuperus T, Echeverry H, van Dijk A. The immunomodulatory effect of vitamin D in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels. *Poult Sci* 2016;95:2547–56. <https://doi.org/10.3382/ps/pew186>.
- [38] Ismailova A, White JH. Vitamin D, infections and immunity. *Rev Endocr Metab Disord* 2022;23:265–77. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09679-5>.
- [39] Duchow EG, Cooke NE, Seeman J, Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D binding protein is required to utilize skin-generated vitamin D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019;116:24527–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915442116>.
- [40] Mathis G, Boland R, Bachmann H, Toggenburger A, Rambeck W. Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D3 of herbal origin in broiler chicken. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016;158:819–26. <https://doi.org/10.17236/sat00097>.
- [41] Nagaoka H, Mochida Y, Atsawasuwan P, Kaku M, Kondoh T, Yamauchi M. 1,25(OH)₂ D₃ regulates collagen quality in an osteoblastic cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:674–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.036>.
- [42] Fatemi SA, Elliott KEC, Macklin KS, Bello A, Peebles ED. Effects of the In Ovo Injection of Vitamin D₃ and 25-Hydroxyvitamin D₃ in Ross 708 Broilers Subsequently Challenged with Coccidiosis: II Immunological and Inflammatory Responses and Small Intestine Histomorphology. *Animals* 2022;12:1027. <https://doi.org/10.3390/ani12081027>.
- [43] Rostagno HS, Albino LFT, Calderano AA, Hanas MI, Sakomura NK, Perazzo F, et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. vol. 5. Suprema. Visconde Do Rio Branco: 2024.
- [44] Sakomura NK, Rostagno SH. Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos. vol. 2. Jaboticabal: 2016.
- [45] Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Pathology, vol. 3, New York: 1968.
- [46] Kisielinski K, Willis S, Prescher A, Klosterhalfen B, Schumpelick V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clin Exp Med* 2002;2:131–5. <https://doi.org/10.1007/s102380200018>.
- [47] Nunes RV, Broch J, Wachholz L, de Souza C, Damasceno JL, Oxford JH, et al. Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. *Poult Sci* 2018;97:3746–54. <https://doi.org/10.3382/ps/pey217>.
- [48] Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. vol. 3. Viçosa: 2006.
- [49] Crenshaw TD, Peo ER, Lewis AJ, Moser BD. Bone Strength as a Trait for Assessing Mineralization in Swine: a Critical Review of Techniques Involved. *J Anim Sci* 1981;53:827–35. <https://doi.org/10.2527/jas1981.533827x>.
- [50] Edwards HM. The Effect of Dietary Cholecalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on the Development of Tibial Dyschondroplasia in Broiler Chickens in the Absence and Presence of Disulfiram. *J Nutr* 1989;119:647–52. <https://doi.org/10.1093/jn/119.4.647>.
- [51] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [52] SAS Institute. SAS University Edition: Installation Guide for Windows 2014.
- [53] Li D, Zhang K, Bai S, Wang J, Zeng Q, Peng H, et al. Effect of 25-Hydroxycholecalciferol with Different Vitamin D₃ Levels in the Hens Diet in the Rearing Period on Growth Performance, Bone Quality, Egg Production, and Eggshell Quality. *Agriculture* 2021;11:698. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080698>.
- [54] El-fiky, AA., Abdou, FH., Enab, AA., Gad, Yasmin S., Selim, Dina A. Influence of in ovo injection with vitamin D₃ on some physiological parameters and bone development of norfa chicks. *Menoufia Journal of Animal Poultry and Fish Production* 2022;6:73–87. <https://doi.org/10.21608/mjapfp.2022.236043>.
- [55] Wen J, Livingston KA, Persia ME. Effect of high concentrations of dietary vitamin D₃ on pullet and laying hen performance, skeleton health, eggshell quality, and yolk vitamin D₃ content when fed to W36 laying hens from day of hatch until 68 wk of age. *Poult Sci* 2019;98:6713–20. <https://doi.org/10.3382/ps/pez386>.
- [56] Saunders-Blades JL, Korver DR. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poult Sci* 2015;94:1233–46. <https://doi.org/10.3382/ps/pev002>.
- [57] Bonagurio LP, Murakami AE, Cruz FK, Kaneko IN, Gasparino E, Oliveira CAL, et al. Dietary supplementation with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol on the incubation performance and fertility of European quail breeders. *Poult Sci* 2022;101:101823. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101823>.

- [58] Landy N, Toghyani M. Evaluation of one-alpha-hydroxy-cholecalciferol alone or in combination with cholecalciferol in Ca P deficiency diets on development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *Animal Nutrition* 2018;4:109–12. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.11.002>.
- [59] Warren MF, Livingston KA. Implications of Vitamin D Research in Chickens can Advance Human Nutrition and Perspectives for the Future. *Curr Dev Nutr* 2021;5:nzab018. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab018>.
- [60] Han J, Wu L, Lv X, Liu M, Zhang Y, He L, et al. Intestinal segment and vitamin D3 concentration affect gene expression levels of calcium and phosphorus transporters in broiler chickens. *J Anim Sci Technol* 2022. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e78>.
- [61] Goncalves A, Roi S, Nowicki M, Dhaussy A, Huertas A, Amiot M-J, et al. Fat-soluble vitamin intestinal absorption: Absorption sites in the intestine and interactions for absorption. *Food Chem* 2015;172:155–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.021>.
- [62] Christakos S, Lieben L, Masuyama R, Carmeliet G. Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep* 2014;3. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.230>.
- [63] Hu YX, van Baal J, Hendriks WH, Duijster M, van Krimpen MM, Bikker P. Mucosal expression of Ca and P transporters and claudins in the small intestine of broilers is altered by dietary Ca:P in a limestone particle size dependent manner. *PLoS One* 2022;17:e0273852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273852>.
- [64] Setiyaningsih N, Jayanegara A, Wardani WW. Effects of a Vitamins D and C Supplement on Performance, Hatchability and Blood Profiles of Broiler Breeders. *J Worlds Poult Res* 2023. <https://doi.org/10.36380/jwpr.2023.7>.
- [65] Colet S, Garcia R, Almeida Paz I, Caldara F, Borille R, Royer A, et al. Bone characteristics of broilers supplemented with vitamin D. *Rev Bras Cienc Avic* 2015;17:325–32. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1703325-332>.
- [66] Bachmann H, Autzen S, Frey U, Wehr U, Rambeck W, McCormack H, et al. The efficacy of a standardised product from dried leaves of *Solanum glaucophyllum* as source of 1,25-dihydroxycholecalciferol for poultry. *Br Poult Sci* 2013;54:642–52. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.825692>.
- [67] 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* 2020;99:364–73. <https://doi.org/10.3382/ps/pez502>.
- [68] Pande V V., Chousalkar KC, Bhanugopan MS, Quinn JC. Super pharmacological levels of calcitriol (1,25-(OH)2 D3) inhibits mineral deposition and decreases cell proliferation in a strain dependent manner in chicken mesenchymal stem cells undergoing osteogenic differentiation in vitro. *Poult Sci* 2015;94:2784–96. <https://doi.org/10.3382/ps/pev284>.
- [69] Kermani ZA, Taheri HR, Faridi A, Shahir MH, Baradaran N. Interactive effects of calcium, vitamin D3, and exogenous phytase on phosphorus utilization in male broiler chickens from 1 to 21 days post-hatch: A meta-analysis approach. *Anim Feed Sci Technol* 2023;295:115525. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115525>.
- [70] Souza CS, Vieites FM, Vasconcellos CHF, Calderano AA, Nunes RV, Ferreira CM, et al. Suplemento de 1,25 dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013;65:519–25. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200031>.
- [71] Cao S, Li T, Shao Y, Zhang L, Lu L, Zhang R, et al. Regulation of bone phosphorus retention and bone development possibly by related hormones and local bone-derived regulators in broiler chicks. *J Anim Sci Biotechnol* 2021;12:88. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00610-1>.
- [72] Leyva-Jimenez H, Khan M, Gardner K, Abdaljaleel RA, AL-Jumaa Y, Alsadwi AM, et al. Developing a novel oral vitamin D3 intake bioassay to re-evaluate the vitamin D3 requirement for modern broiler chickens. *Poult Sci* 2019;98:3770–6. <https://doi.org/10.3382/ps/pez074>.
- [73] Ribeiro MV, Cristo AB de, Bordignon HLF, Simões EP, Bittencourt LC, Fernandes JIM. Supplementation of minerals and vitamins in broiler diets: effect on performance and bone quality. *Ciência Animal Brasileira* 2021;22. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-67656>.
- [74] Yusuf GM, Sumiati S, Mutia R, Wardani WW, Akbar I, Putri NDS. Performance, Egg Quality, Bone Health, and Immunity Assessments of Lohmann Laying Hens Supplemented with Vitamin D3 in the Diet. *Tropical Animal Science Journal* 2023;46:461–70. <https://doi.org/10.5398/tasj.2023.46.4.461>.
- [75] Zhou XY, Chen XC, Fraley GS, Zhang KY, Tian G, Bai SP, et al. Effects of different dietary vitamin D combinations during the grower phase and the feed restriction phase on growth performance and sternal morphology, mineralization, and related genes expression of bone metabolism in Pekin ducks. *Poult Sci* 2023;103291. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103291>.
- [76] Hanel A, Veldhuizen C, Carlberg C. Gene-Regulatory Potential of 25-Hydroxyvitamin D3 and D2. *Front Nutr* 2022;9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.910601>.
- [77] Robinson-Cohen C, Bartz TM, Lai D, Ikizler TA, Peacock M, Imel EA, et al. Genetic Variants Associated with Circulating Fibroblast Growth Factor 23. *Journal of the American Society of Nephrology* 2018;29:2583–92. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018020192>.

- [78] Bolt MJG, Cao L-P, Kong J, Sitrin MD, Li YC. Vitamin D receptor is required for dietary calcium-induced repression of calbindin-D9k expression in mice. *J Nutr Biochem* 2005;16:286–90. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.12.011>.
- [79] Gloux A, Le Roy N, Ezagal J, Mème N, Hennequet-Antier C, Piketty 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* 2020;72:106407. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106407>.
- [80] Lv X, Hao J, Wu L, Liu M, He L, Qiao Y, et al. Age quadratically affects intestinal calcium and phosphorus transporter gene expression in broiler chickens. *Anim Biosci* 2022;35:1921–8. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0058>.
- [81] Chen Y, Ma H, Du Y, Dong J, Jin C, Tan L, et al. Functions of 1,25-dihydroxy vitamin D3, vitamin D3 receptor and interleukin-22 involved in pathogenesis of gout arthritis through altering metabolic pattern and inflammatory responses. *PeerJ* 2021;9:e12585. <https://doi.org/10.7717/peerj.12585>.

1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo em dietas de matrizes e frangos de corte

Resumo: Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação de 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$) no desempenho, parâmetros bioquímicos sanguíneos, saúde óssea, histomorfometria intestinal e expressão gênica de frangos provenientes de matrizes suplementadas ou não com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Um total de 1.152 pintos de um dia, machos da linhagem Ross 308 AP, foram distribuídos em um delineamento experimental completamente casualizado com arranjo fatorial 2×3 . Um fator foi a inclusão ou não de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta das matrizes de 21 a 62 semanas de idade. O outro fator envolveu três níveis (0, 50 e 100 mg/kg) de inclusão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. O estudo contou com seis tratamentos, oito repetições e 24 aves por unidade experimental. As matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ resultaram em frangos de corte mais pesados ao nascimento, melhor conversão alimentar e maiores concentrações de calbindina D28K, interleucina 10 e interleucina 1β aos 21 dias de idade. Conclui-se que a suplementação nas matrizes melhora o crescimento e a imunidade dos frangos de corte até os 21 dias de idade.

Palavras-chave: Expressão gênica; nutrição; aves; vitamina D

1,25-Dihydroxycholecalciferol glycoside in diets for breeders and broilers

Abstract

This study aimed to investigate the effects of supplementation with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$) on performance, blood biochemical parameters, bone health, intestinal histomorphometry, and gene expression in broilers from breeders that were either supplemented or not supplemented with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. A total of 1,152 one-day-old male chicks of the Ross 308 AP strain were allocated in a completely randomized experimental design in a 2×3 factorial arrangement. One factor was the inclusion or not of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ in breeder diets from 21 to 62 weeks of age. The second factor involved three levels (0, 50, and 100 mg/kg) of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ supplementation in the broiler diets from 1 to 21 days of age. The study included six treatments, eight replicates, and 24 birds per experimental unit. Breeders supplemented with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ produced broilers that were heavier at hatch, showed better feed conversion, and had higher concentrations of calbindin D28K, interleukin-10,

and interleukin-1 β at 21 days of age. It is concluded that supplementation in breeders improves growth and immunity in broilers up to 21 days of age.

Keywords: Gene expression; nutrition; poultry; vitamin D

INTRODUÇÃO

Em frangos modernos, o rápido crescimento muscular combinado com o suporte esquelético ainda em desenvolvimento pode levar a uma maior incidência de desafios metabólicos, problemas ósseos e dificuldades locomotoras ao longo do crescimento [1–3]. Ao mesmo tempo, a busca por ganho de peso nas aves pode resultar em desequilíbrios biomecânicos no desenvolvimento esquelético, levando a problemas como mobilidade restrita, claudicação e outras deformidades ósseas [4,5]. Notavelmente, a discondroplasia tibial é observada na fase inicial de crescimento, enquanto problemas estruturais e distorções nos ossos longos podem ocorrer nas fases posteriores [6–8]. Essas complexidades no desenvolvimento de frangos modernos requerem atenção especial para minimizar impactos negativos potenciais na saúde e bem-estar das aves durante o ciclo de produção [9,10].

Nesse contexto, a suplementação vitamínica desempenha um papel crucial na redução de problemas de mobilidade e deformidades ósseas [11,12], particularmente a vitamina D₃, que atua como um cofator metabólico essencial, influenciando significativamente o metabolismo ósseo e a regulação do cálcio e fósforo nas aves [4,13,14]. Estudos sugerem que a suplementação de vitamina D₃ nas dietas pode minimizar distúrbios esqueléticos e contribuir para o crescimento e imunidade melhorados nas aves [18,39,41–43]. Entre os metabolitos da vitamina D₃, o 1,25-Dihidroxicolecalciferol, a forma ativa da vitamina D₃, desempenha um papel crítico na absorção de cálcio e fósforo no trato intestinal das aves [1,4,9,15,18–20], promovendo uma captação eficiente de minerais no corpo [17,21,22]. Essa função é essencial para o adequado desenvolvimento esquelético, garantindo a formação e saúde óssea das aves [23–25].

O 1,25-Dihidroxicolecalciferol também pode ser encontrado em forma glicosídica em algumas plantas, como o *Solanum glaucophyllum* [1,9,10,15,26]. Nessa forma glicosilada (1,25(OH)₂D₃-G), o composto de vitamina D₃ está ligado a moléculas de glicose [27], conferindo-lhe uma ação prolongada e direcionada nos intestinos das aves [7,10,27–29]. Quando consumido, as aves podem metabolizar essa forma glicosilada de 1,25-Dihidroxicolecalciferol, permitindo a liberação gradual da substância ativa, estendendo o tempo de atividade no intestino das aves e melhorando sua eficácia na regulação do metabolismo de cálcio e fósforo [15,30]. Essa forma oferece uma alternativa natural para a suplementação de vitamina D₃, com propriedades que podem beneficiar o sistema digestivo e a absorção desses minerais essenciais [15,31,32].

Pesquisas recentes destacam que a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G não só melhora a mineralização óssea nas aves, promovendo uma estrutura esquelética mais forte e resiliente [9,32–38],

mas também desempenha um papel fundamental no aprimoramento do transporte eficiente de minerais essenciais, como cálcio e fósforo. Além disso, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ desempenha um papel vital no fortalecimento da resposta imunológica, melhorando a defesa contra patógenos [8,39,40].

Essa substância desencadeia uma série de eventos bioquímicos que influenciam positivamente as defesas naturais do corpo [18,24]. Estudos recentes de pesquisadores como [10] destacam que a suplementação adequada de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ está associada a melhorias significativas nas capacidades de defesa das aves. Ao aprimorar a resposta imunológica, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ pode aumentar a eficácia das barreiras naturais, como a integridade mucosa e a produção de substâncias antimicrobianas [5]. Além disso, essa substância ativa pode modular a expressão gênica de citocinas e outros mediadores imunes, contribuindo para um ambiente imunológico mais equilibrado e responsivo [19,20,36].

Nesse contexto, a importância do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ no organismo das aves vai além de seu papel tradicional na saúde óssea [9]. Sua influência na defesa contra patógenos se destaca como um fator crucial na manutenção da saúde geral das aves, proporcionando benefícios significativos para a produção avícola [18,39,41–43]. No entanto, determinar a dosagem ideal para a incorporação nas dietas das aves continua sendo um ponto de controvérsia [5,19,20,44]. A falta de definição precisa nesta área apresenta um desafio substancial, pois doses inadequadas podem resultar em problemas de toxicidade [4,6,39,45,46]. Essa incerteza sublinha a importância de realizar estudos para otimizar benefícios oferecidos por essa forma de vitamina D_3 [15,20,21,32,47–51].

Portanto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de frangos de corte, provenientes de matrizes (62 semanas de idade) suplementadas ou não com o mesmo composto. Foram avaliados o desempenho, os parâmetros bioquímicos sanguíneos, a saúde óssea, a histomorfometria intestinal e a expressão gênica em frangos de corte aos 21 dias de idade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Declaração de Ética Animal

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – UNIOESTE (Protocolo nº 01/2021) e previamente autorizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, em conformidade com a Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018.

Animais e Delineamento Experimental

Dois galpões de matrizes (G1 e G2) foram construídos no município de Pato Branco, Paraná, Brasil, com o objetivo de abrigar 8.000 matrizes de frangos de corte da linha AP95 (Aviagen) com 21 semanas de idade. Os galpões eram idênticos em termos de características físicas, e as práticas de manejo

foram padronizadas para ambas. Cada galpão media 175 m x 13 m, foi construído com estrutura metálica, coberta com telhado de Brasilit, e possuía altura de teto de 3 metros, sem isolamento. Os galpões foram equipados com telas e cortinas brancas, além de ventiladores para manter a ventilação por pressão positiva. Os ninhos eram mecânicos, enquanto o sistema de alimentação consistia em alimentadores automáticos, especificamente projetados para matrizes de frangos de corte, e os bebedouros eram do modelo pendular.

As dietas fornecidas às matrizes nos galpões (G1 e G2) eram idênticas, formuladas com milho e farelo de soja para atender às necessidades nutricionais durante todo o período produtivo (21 a 62 semanas de idade). No entanto, as matrizes de frango de corte do G1 receberam uma dieta farelada suplementada com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dosagem de 100 mg/kg, a partir das 21 semanas de idade, enquanto as matrizes do G2 receberam uma dieta farelada sem suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Tanto as matrizes do G1 quanto G2 foram mantidas nas condições ambientais, com temperatura e umidade controladas, seguindo práticas padrão de manejo para matrizes de frangos de corte.

Com 62 semanas de idade, os ovos de cada galpão foram coletados separadamente, identificados, selecionados e higienizados. Em seguida, os ovos foram incubados em incubadoras (Jamesway série Platinum) onde permaneceram por um período de 18 dias, mantidos a uma temperatura de 37,5°C e umidade relativa de 60%. Após os 18 dias de incubação, os ovos foram transferidos para os nascedouros, onde permaneceram a uma temperatura de 37,2°C e umidade relativa de 65% até ocorrer a eclosão dos ovos.

Após o nascimento, os pintos de corte de um dia foram sexados e vacinados para as doenças de Marek, Bouda Aviária, Gumboro e bronquite infecciosa no incubatório. Em seguida, foram identificados com base na origem das matrizes, considerando a suplementação ou não de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, e posteriormente, foram encaminhados ao Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon, Paraná - Brasil.

Um total de 1152 pintos de corte, machos, de um dia, da linhagem Ross 308 AP95, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 3. Um dos fatores considerou a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes (0,0 e 100 mg/kg) e o outro, três níveis (0,0; 50 e 100 mg/kg) de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte, totalizando seis tratamentos, com oito repetições de 24 aves por unidade experimental. Aos 21 dias de idade foram analisados o desempenho, os parâmetros bioquímicos sanguíneos, a saúde óssea, a histomorfometria intestinal e a expressão gênica nos frangos de corte.

As aves foram mantidas em um aviário experimental com dimensões de 35 metros de comprimento por 13 metros de largura, dividido em seções contendo múltiplas unidades experimentais. Cada unidade experimental tinha uma área de 1,96 m² e estava equipada com comedouro tubular, bebedouros do tipo *nipple* e piso de concreto. O controle da temperatura ambiente foi realizado pelo

painel Smaai IV, que operava a fornalha de aquecimento a pellets, os quatro exaustores e os painéis evaporativos. O programa de iluminação seguiu as diretrizes do manual da linhagem. A refrigeração do ambiente e a renovação do ar eram asseguradas pelos exaustores e painéis evaporativos. As temperaturas média, mínima e máxima, assim como a umidade relativa, foram monitoradas diariamente e mantidas dentro da faixa de conforto térmico recomendada para cada fase.

Dietas e Manejo Alimentar

As dietas experimentais (Tabela 1) foram isonutritivas e isocalóricas, à base de milho e farelo de soja, formuladas de acordo com as recomendações nutricionais de [52]. A vitamina utilizada neste estudo, 1,25(OH)₂D₃-G, foi proveniente do produto Panbonis® 10, obtido a partir de *Solanum glaucophyllum*, na forma de pó, padronizado com amido de trigo pré-gelatinizado e farelo de trigo. Sua composição analítica inclui 1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (mínimo de 10 ppm), umidade (máximo de 14%), proteína bruta (14-18%), fibra bruta (5,25-8,75%), extrato etéreo (3-6%), cinzas brutas (3-6%), sódio (0,0-0,7%), lisina (0,6-0,9%) e metionina (0,2-0,4%).

A ração fornecida às aves durante todo o período experimental foi na forma farelada. Os micronutrientes, juntamente com o 1,25(OH)₂D₃-G, foram pesados e misturados manualmente em sacos de 5 kg. Em seguida, essa mistura foi transferida para um misturador vertical Premiata PRM, com capacidade de 500 kg, onde foi homogeneizada com os demais ingredientes da dieta por 10 minutos para garantir a distribuição uniforme. Após a mistura, a ração foi ensacada em sacos de 30 kg. A adição de 1,25(OH)₂D₃-G substituiu proporcionalmente o material inerte na ração (g g⁻¹) e foi suplementada conforme a descrição na tabela 2.

Tabela 4. Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Pré-inicial (1-7 dias)	Inicial (8-14 dias)	Crescimento (15-21 dias)
Milho (7,88%)	504,76	525,03	589,79
Farelo de soja (46%)	423,88	402,13	333,75
Óleo de soja degomado	29,70	33,66	39,07
Fosfato bicálcico	17,86	16,37	15,04
Calcário calcítico	9,39	8,64	8,62
Sal comum	4,02	3,68	3,36
Bicarbonato de sódio	1,00	1,50	2,00
Lisina sulfato (60%)	1,70	1,75	
Lisina sulfato (54,7%)			2,20
DL-Metionina (99%)	3,27	3,09	2,58
L-Treonina (99%)	0,47	0,42	0,31
Cloreto de colina (60%)	0,50	0,50	0,50
Adsorvente ¹	1,00	1,00	1,00
Premix vitamínico ²	1,30	1,00	1,00
Premix mineral ³	0,50	0,50	0,50
Coccidiostático ⁴	0,55	0,55	0,20

Enramicina ⁵		0,08	0,08
Inerte (caulim) ⁶	0,10	0,10	
Energia metab. (kcal kg ⁻¹)	3000	3050	3150
Proteína bruta (g kg ⁻¹)	240,471	231,848	205,060
Lisina digestível (g kg ⁻¹)	13,000	12,50	11,000
Met. + Cist. digestível (g kg ⁻¹)	9,620	9,250	8,140
Treonina digestível (g kg ⁻¹)	8,580	8,250	7,260
Valina digestível (g kg ⁻¹)	10,000	9,630	8,470
Trp. digestível (g kg ⁻¹)	2,804	2,688	2,323
Arginina digestível (g kg ⁻¹)	15,196	14,573	12,619
Cálcio (g kg ⁻¹)	9,500	8,780	8,220
Fósforo disponível (g kg ⁻¹)	4,500	4,190	3,840
Sódio (g kg ⁻¹)	2,000	2,000	2,000
Potássio (g kg ⁻¹)	9,372	9,039	7,995

¹Adisorvente – bentonita. ²Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta na ração pré-inicial: Vitamina A (min) 14.300 U.I.; Vitamina D₃ (min) 5.200 U.I.; Vitamina E (min) 71,50 U.I.; Vitamina K₃ (min) 3,90 mg; Vitamina B₁ (min) 2,99 0mg; Vitamina B₂ (min) 9,10 mg; Ácido pantotênico (min) 15,60 mg; Vitamina B₆ (min) 5,20 mg; Vitamina B₁₂ (min) 32,50 mg; Ácido nicotínico (min) 78,00 mg; Ácido fólico (min) 2,60 mg; Biotina (min) 0,33 mg; Selênio (min) 0,39 mg. Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta nas dietas inicial, crescimento e terminação: Vitamina A 11.000 UI; Vitamina D₃ 4.000 UI; Vitamina E 55 UI; Vitamina K₃ 3,00 mg; Tiamina (B₁) 2,30 mg; Riboflavina (B₂) 7,00 mg; Piridoxina (B₆) 4,00 mg; Cianocobalamina (B₁₂) 25,00 mg; Ácido pantotênico (B₅) 12,00 mg; Niacina (B₃) 60,00 mg. Ácido fólico (B₉) 2,00 mg. Biotina (B₇) 0,25 mg. Selênio 0,30 g. ³Suplemento mineral, composição por kg de dieta: Ferro (min) 50g; Cobre (min) 10g; Manganês (min) 65g; Zinco (min) 65g; Iodo (min) 1000 mg. ⁴Anticoccidiano: de 1 a 21 dias de idade utilizado salinomocina 12% (Coxistac 12%) e de 22 a 35 dias de idade salinomocina 24% (Salinocox 24%). ⁵Enramicina 8% (Enradin 8%). ⁶Inerte a base de caulim, sendo a inclusão do 1,25(OH)₂D₃-G em função da substituição de peso por peso pelo inerte.

Tabela 2. Suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) em dietas de frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com o mesmo aditivo.

Vitamina D ₃ Matrizes, mg/kg	Vitamina D ₃ Frangos, mg/kg
0,0	0,0
0,0	50
0,0	100
100	0,0
100	50
100	100

Desempenho

As aves e a ração foram pesadas no início do período experimental e aos 21 dias de idade para determinar o consumo médio de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar. A mortalidade foi registrada diariamente para ajuste do consumo de ração e da conversão alimentar [53].

Histomorfometria intestinal

Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental foi eutanasiada por deslocamento cervical para retirada do aparelho digestório para avaliação da morfometria intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta, área de absorção e relação vilo: cripta). O intestino delgado foi exposto e o jejuno foi separado para a amostragem. No jejuno, o segmento foi da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Coletou-se um fragmento de 2 cm do jejuno, a 5 cm antes do divertículo de Meckel. Esse fragmento foi fixado em solução de formalina tamponada (10%), desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em parafina. Em seguida, cortes semisseriados de 5 µm de cada segmento foram dispostos em lâminas de vidro e corados utilizando a técnica de hematoxilina-eosina, conforme descrito por [53]. As medições foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE4.1. Em cada lâmina, foram registrados o comprimento e a largura dos vilos, assim como a profundidade e a largura das criptas. Essas medidas morfométricas foram utilizadas para calcular a área da superfície de absorção da mucosa intestinal, seguindo a fórmula descrita por [54]. Com os resultados de altura de vilo e profundidade de cripta foi calculada a relação vilo:cripta.

Perfil bioquímico sanguíneo

Aos 21 dias de idade, dois frangos de corte próximos ao peso médio de cada repetição foram selecionados aleatoriamente para a coleta de sangue (4 mL) por punção da veia ulnar, enquanto as aves estavam posicionadas em decúbito lateral. As amostras foram analisadas para cálcio, fósforo, lactato desidrogenase, creatina fosfoquinase e fosfatase alcalina. Para a coleta, foram utilizados tubos a vácuo específicos com ativador de coágulo e capacidade de 5 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil), além de adaptadores e agulhas de 25 x 0,8 mm (Labor Import, Shandong Weigao, China). Após a coleta, as amostras foram mantidas em posição horizontal por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas (K14-4000, Kasvi, Paraná, Brasil) a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a separação do soro, as amostras foram devidamente identificadas, transferidas para microtubos de 2 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) e armazenadas em um freezer a -20°C até o momento da análise [56].

Para as leituras, as amostras foram descongeladas sob refrigeração a 4°C e mantidas no refrigerador por no máximo 8 horas. Antes da análise, foram centrifugadas em uma microcentrífuga (Eppendorf®, modelo Minispin®, Hamburgo, Alemanha) a 1050 g por 10 minutos à temperatura ambiente para remoção de eventuais traços de fibrina. Os parâmetros bioquímicos foram mensurados utilizando um analisador bioquímico automático com espectrofotometria, especificamente o Flexor EL200 (marca Elitech®, modelo Flexor EL200, Puteaux, França). A análise foi conduzida com reagentes, calibradores (Elical II) e padrões de controle (Elitol I) da marca Elitech®.

Resistencia a quebra da tibia e sua composição

As tíbias de aves eutanasiadas aos 21 dias de idade foram limpas e posteriormente, utilizadas para determinar a matéria seca em estufa com circulação de ar (105°C). Em seguida, foram calcinadas por 8 horas em mufla a 600°C para obtenção da matéria mineral (cinzas). Os teores de cálcio e fósforo na tibia foram determinados conforme a metodologia descrita por [58]. A concentração de cálcio foi analisada por espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS), enquanto o fósforo foi quantificado por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS). A tibia esquerda foi utilizada para determinar a resistência óssea, empregando o analisador de textura Brookfield CT3. Esse equipamento possui uma base que sustenta as áreas epifisárias do osso e aplica uma força de 5 mm/s com carga de 200 kgf na região central do osso (diáfise). Durante a análise, a tibia foi posicionada no suporte sempre da mesma maneira. Os resultados foram expressos em quilograma-força (kgf) [59-60].

Expressão gênica

Aos 21 dias de idade, uma ave por unidade experimental recebeu estímulo através da administração intraperitoneal de 1 mg de LPS (lipopolissacarídeos de *E. coli*, Sigma) por peso corporal. Após 4 horas, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, imediatamente, um fragmento do jejuno foi coletado e imerso na solução estabilizadora RNeasy Lysis Reagent™ (Invitrogen, EUA), que foi posteriormente armazenada em um freezer a -20°C até a extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando o QIAzol Lysis Reagent (Qiagen GmbH, Germany). Aproximadamente 70 mg de intestino de frango foi pesado, triturado e adicionado em microtubo, livre de DNase e RNase, contendo 500 µL de Trizol. As amostras foram homogeneizadas (vórtex), incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 100 µL de clorofórmio foi adicionado, seguido de homogeneização manual por 15 segundos. Após isso, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12.000 × g, a 4°C. A fase aquosa foi coletada em novo tubo, e adicionado 250 µL de isopropanol, seguido por incubação por 10 minutos (temperatura ambiente) com homogeneização manual e centrifugação por 15 minutos a 12000 × g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a 7500 × g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado para a secagem do *pellet*, por 15 minutos, e então ressuspensas em água ultrapura livre de DNase e RNase e incubadas a 60°C por 15 minutos.

A concentração de RNA para as interleucinas (IL-1β e IL-10), calbindina-D28K (CALB-D28K) e β-actina (gene para controle endógeno) foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA), no comprimento de onda de 260/280 nm, e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) e visualizada em aparelho transiluminador com luz ultravioleta.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com as normas do fabricante, considerando 1 µg de RNA e volume final de 20 µL. Para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, cada amostra foi tratada com 2 µL de *gDNA Wipeout Buffer* (Qiagen GmbH, Germany) e incubada a 45°C por 2 min. Após remoção do DNA genômico, foi adicionado 4 µL *Quantiscript RT Buffer*, 1 µL *RT Primer Mix Reverse Transcription Mix* e 1 µL *Quantiscript Reverse Transcriptase*. A reação de transcriptase reversa foi incubada por 15 min a 42°C, seguida de 95°C por 3 min, sendo imediatamente colocada no gelo. As amostras foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenadas a -20°C até o momento do uso. Os *primers*/oligonucleotídeos utilizados nas reações foram obtidos a partir de trabalhos publicados de *Gallus gallus* (Tabela 2). As sequências dos *primers* foram alinhadas utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O gene da β -actina foi considerada como gene de referência/*housekeeping*, e sua estabilidade entre os tratamentos foi avaliada utilizando o programa *Statistica*® 7.0.

Table 3. Genes and primer sequences for gene expression analysis using qPCR.

Gene	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Reference
β -actina	F: TTCTTTTGGCGCTTGACTCA R: GCGTTCGCTCCAACATGTT	88	[60]
CALB-D28K	F: TTGGCACTGAAATCCCACTGAA R: CATGCCAAGACCAAGGCTGA	116	NM_205513.2
IL-1 β	F: GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG R: TGTCGATGTCCCGCATGA	80	NM_204524.2
IL-10	F: CATGCTGCTGGGCCTGAA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	94	NM_001004414.4

CALB-D28K: Calbindin D28K, IL-1 β : Interleukin-1 beta, IL-10: Interleukin 10.

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada *primer*, foi realizado diluições seriadas do *pool* de amostras de cDNA contendo todos os tratamentos, utilizando diferentes concentrações dos iniciadores. Para β -actina, CALB-D28K e IL-10 foi considerado 200 ng de cDNA e 400 nM de *primer*, e para IL-1 β , 200 ng cDNA e 600 nM de *primer*. As análises de qRT-PCR foram conduzidas em Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germany), utilizando o *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* (Qiagen GmbH, Germany) em duplicatas. O volume total da reação foi de 20 µl. As condições de amplificação foram: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 seg, e 60°C por 10 seg. A curva de dissociação (*melt curve*) dos produtos da reação foi obtida, para determinar a especificidade das reações. Os dados de expressão gênica relativa foram registrados como valores de Ct (cycle threshold) e foram normalizados utilizando a média dos valores de Ct obtidos para o gene de referência em cada amostra, para cada tratamento e

para cada gene alvo, conforme recomendado por [61]. O método $2^{-\Delta Ct}$ [61] foi usado para quantificação relativa da expressão gênica (expressa como unidades arbitrárias, AU).

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variância pelo teste de Levene, ambos conduzidos por meio do procedimento Univariate. Para os dados com distribuição normal, foi realizada análise de variância (ANOVA) bifatorial para avaliar os efeitos da suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ em matrizes e frangos de corte, bem como possíveis interações entre esses fatores. Quando efeitos significativos foram detectados, as médias dos tratamentos das matrizes foram comparadas pelo teste F, enquanto as médias dos tratamentos dos frangos de corte foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SAS, adotando o nível de significância de 5% [62].

RESULTADOS

Desempenho

O desempenho dos frangos de corte aos 21 dias de idade não mostrou interação significativa ($p > 0,05$) entre os efeitos da suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes e a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte. No entanto, as matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ produziram frangos de corte mais pesados ($p = 0,001$) no nascimento (Tabela 4). Além disso, observou-se efeito da inclusão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte, resultando em menor conversão alimentar ($p = 0,001$) aos 21 dias de idade, quando comparados aos frangos de corte que não receberam a suplementação.

Tabela 4. Desempenho de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$), provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vitamina D_3 mg/kg	PIM, g/aves	CRM, g/aves	GPM, g/aves	CA, /g GPM
Vitamina D_3 Matrizes				
0,0	47,73 ^b	1154	917	1,261
100	48,48 ^a	1157	923	1,254
EPM ¹	0,03	5,93	4,31	0,01
Vitamina D_3 Frangos				
0,0	48,12	1167	914	1,279 ^B
50	48,14	1152	920	1,252 ^A
100	48,06	1149	925	1,242 ^A
EPM	0,09	5,89	4,33	0,01
<i>p</i> -Valor				
Vitamina D_3 Matrizes	0,001	0,812	0,480	0,351
Vitamina D_3 Frangos	0,893	0,443	0,603	0,001

Vitamina D ₃ Matrizes x Vitamina D ₃ Frangos interação	0,737	0,672	0,845	0,245
--	-------	-------	-------	-------

¹EPM: Erro padrão da média; PIM: Peso inicial médio; CRM: Consumo de ração médio; GPM: Ganho de peso médio; CA: Conversão alimentar. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%. ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Histomorfometria intestinal

A altura do vilo ($p < 0,004$) e a área de absorção ($p = 0,001$) no jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade mostraram uma interação significativa entre os efeitos da suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes e nas dietas dos frangos de corte (Tabela 5). Ao analisar a interação entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes e dos frangos de corte (Tabela 6), a inclusão deste aditivo em ambas as dietas (matrizes e frangos de corte) não foi suficiente para aumentar a altura dos vilos e a área de absorção nos frangos aos 21 dias de idade. Os frangos de corte provenientes de matrizes não suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram maior altura de vilo e maior área de absorção quando não foram suplementados com o mesmo aditivo.

Tabela 5. Histomorfometria do jejuno de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G), provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vitamina D ₃ mg/kg	AV, μm	PC, μm	AA, μm^2	V:C, μm
Vitamina D ₃ Matrizes				
0,0	780,50	49,17	16,43	15,89
100	745,51	44,51	16,17	17,52
EPM ¹	17,78	1,53	0,53	0,60
Vitamina D ₃ Frangos				
0,0	804,82	46,42	17,44	17,14
50	761,37	49,58	15,55	15,90
100	724,36	44,17	15,92	17,09
EPM	17,48	1,54	0,52	0,61
<i>p</i> -Valor				
Vitamina D ₃ Matrizes	0,205	0,095	0,766	0,181
Vitamina D ₃ Frangos	0,089	0,315	0,329	0,304
Vitamina D ₃ Matrizes x Vitamina D ₃ Frangos interação	0,004	0,105	0,001	0,810

¹EPM: Erro padrão da média; AV: Altura do vilo; PC: Profundidade da cripta; AA: Área de absorção; V:C: Relação vilo: cripta.

Tabela 6. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte, e seu impacto na altura dos vilos e na área de absorção do jejuno de frangos com 21 dias de idade.

Vitamina D ₃ Frangos mg/kg	Altura do Vilo, μm				Área de absorção, μm^2			
	0,0	100	EPM	p-Valor	0,0	100	EPM	p-Valor
0,0	898,52 ^{aA}	722,84 ^B	18,31	0,004	19,74 ^{aA}	15,13 ^B	0,72	0,004
50	780,15 ^{ab}	742,60	36,14	0,599	15,76 ^b	15,34	0,94	0,823
100	677,65 ^b	771,08	24,21	0,066	13,80 ^{bb}	18,03 ^A	0,71	0,008
EPM ¹	20,10	20,03			0,48	0,58		
p-Valor	0,002	0,660			0,001	0,180		

¹EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%. ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Perfil bioquímico sanguíneo

As concentrações de cálcio e fósforo, assim como as variáveis enzimáticas, nos frangos de corte aos 21 dias de idade não mostraram interação significativa ($p > 0,05$) entre os efeitos de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas dos frangos. No entanto, a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes resultou em maior atividade da fosfatase alcalina ($p = 0,004$) nos frangos de corte aos 21 dias de idade (Tabela 7).

Tabela 7. Concentrações de cálcio e fósforo, e atividade enzimática sérica de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G), provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vitamina D ₃ mg/kg	Ca mg/dL	P mg/dL	LDH U/L	CPK U/L	FA U/L
Vitamina D ₃ Matrizes					
0,0	9,48	7,50	683	2162	26500 ^a
100	9,09	7,16	642	2872	20920 ^b
EPM ¹	0,11	0,13	30,56	123,54	412,70
Vitamina D ₃ Frangos					
0,0	9,16	7,24	662	2349	23561
50	9,70	7,48	671	3233	24057
100	9,01	7,27	654	1904	23684
EPM	0,12	0,13	31,05	151,28	316,01
p-Valor					
Vitamina D ₃ Matrizes	0,411	0,184	0,505	0,320	0,004
Vitamina D ₃ Frangos	0,492	0,691	0,965	0,274	0,962
Vitamina D ₃ Matrizes x Vitamina D ₃ Frangos interação	0,758	0,545	0,367	0,611	0,529

¹EPM: Erro padrão da média; Ca: Cálcio; P: Fósforo; LDH: Lactato desidrogenase; CPK: Creatina fosfoquinase; FA: Fosfatase alcalina. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%. ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Resistencia a quebra da tibia e sua composição

Não foram identificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a resistência à quebra da tíbia nos frangos de corte aos 21 dias de idade (Tabela 8). No entanto, as concentrações de cálcio nos frangos de corte aos 21 dias mostraram uma interação significativa ($p = 0,006$) entre os efeitos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas matrizes e a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte. A inclusão de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte aos 21 dias resultou em menores concentrações de cálcio ($p < 0,005$) e fósforo ($p = 0,044$) na tíbia (Tabela 9). Ao analisar a interação da suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ entre matrizes e frangos de corte, observou-se que a inclusão de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas tanto das matrizes quanto dos frangos de corte resultou em menores concentrações de cálcio ($p = 0,003$) nas tíbias dos frangos aos 21 dias de idade (Tabela 9).

Tabela 8. Resistência à fratura da tíbia e composição da tíbia expressa em matéria seca de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$), provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vitamina D ₃ mg/kg	Resistência a quebra da tíbia, kg	Matéria seca, %	Fósforo, %	Cálcio, %
Vitamina D ₃ Matrizes				
0,0	22,45	40,12	11,34	16,23
100	22,28	40,70	11,31	16,27
EPM ¹	0,53	0,33	0,29	0,36
Vitamina D ₃ Frangos				
0,0	21,89	39,72	11,68 ^A	17,51 ^A
50	21,41	40,71	11,96 ^A	16,64 ^A
100	23,77	40,83	10,33 ^B	14,59 ^B
EPM	0,52	0,33	0,27	0,31
<i>p</i> -Valor				
Vitamina D ₃ Matrizes	0,879	0,344	0,966	0,951
Vitamina D ₃ Frangos	0,142	0,306	0,044	0,005
Vitamina D ₃ Matrizes x Vitamina D ₃ Frangos interação	0,726	0,487	0,900	0,006

¹EPM: Erro padrão da média; ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Tabela 9. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$) nas dietas de matrizes e frangos de corte, e seu impacto nas concentrações de cálcio em frangos com 21 dias de idade.

Vitamin D ₃ Frangos, mg/kg	Vitamina D ₃ Matrizes, mg/kg			
	0,0	100	EPM	<i>p</i> -Valor
0,0	16,78	18,25 ^a	0,45	0,118
50	15,98	17,31 ^a	0,63	0,292
100	15,94 ^A	13,25 ^{bB}	0,42	0,005
EPM ¹	0,37	0,45		
<i>p</i> -Valor	0,567	0,003		

¹EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. ^{AB}: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

3.5. Expressão gênica

A expressão gênica de calbindina D28K e das interleucinas 10 e interleucinas 1 β no jejuno de frangos de corte aos 21 dias não mostrou interação significativa ($p > 0,05$) entre os efeitos de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G nas matrizes e a suplementação de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G nas dietas dos frangos. No entanto, foram observadas maiores expressões de calbindina D28K ($p < 0,001$), interleucina 10 ($p = 0,001$) e interleucina 1 β ($p = 0,001$) no jejuno dos frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G. Além disso, a inclusão de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G nas dietas dos frangos de corte ($p = 0,047$) apresentou aumento na expressão de calbindina D28K no jejuno de aves que receberam 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G em suas dietas (Tabela 10).

Tabela 10. Expressão gênica no jejuno de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D $_3$ (1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G), provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vitamina D $_3$ mg/kg	Calbindina D28K	Interleucina 10	Interleucina 1 β
Vitamina D $_3$ Matrizes			
0,0	0.239 ^b	1.557 ^b	1.030 ^b
100	0.358 ^a	1.820 ^a	1.366 ^a
EPM ¹	0.02	0.12	0.07
Vitamina D $_3$ Frangos			
0,0	0.273 ^B	1.781	1.255
50	0.318 ^A	1.707	1.108
100	0.306 ^A	1.599	1.207
EPM	0.02	0.13	0.07
<i>p</i> -Valor			
Vitamina D $_3$ Matrizes	0.001	0.001	0.003
Vitamina D $_3$ Frangos	0.047	0.176	0.461
Vitamina D $_3$ Matrizes x Vitamina D $_3$ Frangos interação	0.122	0.227	0.897

¹EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. ^{AB}: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

DISCUSSÃO

As matrizes suplementadas com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -G produziram pintos mais pesados no nascimento em comparação com as matrizes que não receberam essa suplementação. Isso sugere que a adição dessa substância à dieta das matrizes pode ter influenciado o transferimento de nutrientes para os ovos [63–67]. O melhor transferimento de nutrientes pode levar a embriões mais fortificados e,

consequentemente, mais saudáveis [63,68]. Estudos mostram que a vitamina D₃ pode influenciar a qualidade dos ovos, melhorando a deposição de cálcio na casca do ovo, por exemplo [63–65,69–71].

A melhora na conversão alimentar dos frangos de corte aos 21 dias de idade com a suplementação de 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G sugere uma maior eficiência na absorção de nutrientes da ração. O estudo realizado por [32], que investigou os efeitos de dois níveis de 1,25(OH)₂D₃-G (0 e 1,25 µg/kg) nas dietas de frangos, demonstrou redução na taxa de conversão alimentar e nas taxas de mortalidade entre 1 e 19 dias de idade em comparação com uma dieta basal sem vitamina D. De maneira similar, [3] observou melhoria na conversão alimentar quando os frangos de corte foram suplementados com 1 e 2 µg de 1,25(OH)₂D₃-G de 1 a 21 dias de idade. Esses resultados sugerem que a adição de 1,25(OH)₂D₃-G pode levar a melhorias significativas no desempenho durante a fase de crescimento, alinhando-se aos resultados do presente estudo.

Embora a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G não tenha aumentado a altura do vilos ou a área de absorção, as melhorias observadas na conversão alimentar sugerem que o aditivo pode ter aprimorado a eficiência dos processos metabólicos envolvidos na absorção e utilização de nutrientes [4,5,9,15]. Assim, apesar da ausência de mudanças estruturais no intestino, a suplementação parece ter otimizado a utilização de nutrientes, refletida na melhoria da conversão alimentar dos frangos [5,20].

Além disso, a suplementação pode ter influenciado outros aspectos fisiológicos, como a manutenção da integridade da mucosa intestinal, contribuindo indiretamente para a eficiência da digestão e absorção de nutrientes [10]. Esses fatores, combinados, podem ter permitido que os frangos utilizassem melhor os nutrientes disponíveis na dieta, resultando em uma melhor conversão alimentar, mesmo sem um aumento direto na altura dos vilos ou na área de absorção [32]. Portanto, a melhoria na conversão alimentar pode estar mais estreitamente associada à eficiência metabólica geral e à otimização da absorção de nutrientes essenciais, como cálcio e fósforo, do que a mudanças estruturais visíveis no intestino [4,15,19,20].

A redução da atividade da enzima fosfatase alcalina nos frangos de 21 dias provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G sugere uma resposta metabólica específica associada a esse protocolo de suplementação. A fosfatase alcalina, uma enzima essencial no metabolismo de fosfato, desempenha um papel crucial na regulação do equilíbrio de cálcio e fósforo [30,72]. Essa redução pode indicar um ajuste na homeostase desses minerais durante o início da fase de crescimento das aves, afetando a atividade da fosfatase alcalina [73]. Como consequência desse ajuste, foi observado um aumento significativo nos níveis de deposição de cálcio e fósforo na tíbia dos frangos de corte que receberam a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G até 21 dias de idade.

A ausência de mudanças na resistência óssea da tíbia nos frangos de corte de 21 dias sugere que, apesar das alterações observadas na atividade da fosfatase alcalina e na deposição de cálcio e fósforo em resposta à suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G, essas alterações não foram refletidas em diferenças

detectáveis na resistência óssea [15,26,74]. A falta de distinção na resistência óssea entre os grupos pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a complexidade do metabolismo ósseo e mineral, a influência de outros componentes da dieta e fatores genéticos [30,72,75]. Além disso, é importante considerar que a resistência óssea é influenciada por diversos fatores, como qualidade óssea e densidade, estrutura trabecular e cortical, bem como composição mineral [15,32,76]. Alterações sutis em alguns desses aspectos podem não ser detectadas por meio de medições diretas de deposição mineral ou atividade enzimática [75].

A suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes teve impactos significativos na expressão gênica nos frangos de corte, sugerindo uma influência direta nos processos fisiológicos relacionados à resposta imunológica e ao metabolismo mineral [5,10,17,46]. O aumento na expressão de calbindina D28K nos frangos de corte aos 21 dias de idade, especialmente quando suplementados com 50 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, sugeriu modulação do transporte de cálcio no intestino em resposta à suplementação [77,78]. Isso significa que houve um aumento na produção dessa proteína nas células intestinais e, possivelmente, uma maior contribuição para o desenvolvimento ósseo dos frangos de corte em crescimento [21,34,79, 81, 83].

CONCLUSÃO

A suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes resultou em frangos de corte mais pesados ao nascimento, indicando uma melhora na transferência de nutrientes das matrizes para os ovos. Além disso, esses frangos de corte apresentaram níveis mais altos de interleucina 1 β , interleucina 10 e calbindina D28K aos 21 dias de idade, sugerindo uma resposta imunológica aprimorada e melhor saúde intestinal. Esses benefícios para a saúde se estendem para a fase de crescimento, pois os frangos de corte suplementados com 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G exibiram melhor conversão alimentar, refletindo uma utilização mais eficiente dos nutrientes. Isso indica que a suplementação não apenas melhora a saúde inicial dos frangos de corte, mas também apoia um crescimento mais eficiente e saudável nas fases posteriores.

REFERÊNCIAS

1. Vieites, F.M.; Drosghic, L.C.A.B.; Souza, C.S.; Vargas Júnior, J.G.; Nunes, R.V.; Moraes, G.H.K. de; Corrêa, G.S.S.; Caramori Júnior, J.G. Características Ósseas de Frangos de Corte Alimentados Com Rações Suplementadas Com Solanum Glaucophyllum. *Semin Cienc Agrar* 2016, 37, 381, doi:10.5433/1679-0359.2016v37n1p381.
2. Świątkiewicz, S.; Arczewska-Włosek, A.; Bederska-Lojewska, D.; Józefiak, D. Efficacy of Dietary Vitamin D and Its Metabolites in Poultry - Review and Implications of the Recent Studies. *Worlds Poult Sci J* 2017, 73, 57–68, doi:10.1017/S0043933916001057.
3. Castro, F.L. de S.; Baião, N.C.; Ecco, R.; Louzada, M.J.Q.; Melo, É. de F.; Saldanha, M.M.; Triginelli, M.V.; Lara, L.J.C. Effects of 1,25-Dihydroxycholecalciferol and Reduced Vitamin D3 Level on Broiler Performance and Bone Quality. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2018, 47, doi:10.1590/rbz4720170186.

4. Souza, C.S.; Vieites, F.M. Vitamina D3 e Seus Metabólitos Para Frangos de Corte. *Archivos de Zootecnia* 2014, 63, 11–24, doi:10.21071/az.v63i241.588.
5. Hsiao, F.S.-H.; Cheng, Y.-H.; Han, J.-C.; Chang, M.-H.; Yu, Y.-H. Effect of Different Vitamin D3 Metabolites on Intestinal Calcium Homeostasis-Related Gene Expression in Broiler Chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2018, 47, doi:10.1590/rbz4720170015.
6. Aye Cho, T.-Z.; Sadiq, M.B.; Srichana, P.; Anal, A.K. Vitamin D3 Enhanced Intestinal Phosphate Cotransporter Genes in Young and Growing Broilers. *Poult Sci* 2020, 99, 2041–2047, doi:10.1016/j.psj.2019.11.038.
7. Trautenmüller, H.; Genova, J.L.; Santos, L.B. de A. dos; Leal, I.F.; Santos, G. de B.; Rupolo, P.E.; Nunes, R.V.; Oliveira, E.R. de; Carvalho, P.L. de O. Partial Cholecalciferol Replacement with 1,25-Dihydroxycholecalciferol Glycoside in Diets for Piglets. *Anim Prod Sci* 2022, 62, 1590–1599, doi:10.1071/AN21150.
8. Khan, R.U.; Naz, S.; Ullah, H.; Khan, N.A.; Laudadio, V.; Ragni, M.; Piemontese, L.; Tufarelli, V. Dietary Vitamin D: Growth, Physiological and Health Consequences in Broiler Production. *Anim Biotechnol* 2023, 34, 1635–1641, doi:10.1080/10495398.2021.2013861.
9. Vieites, F.M.; Drogic, L.C.A.B.; Souza, C.S.; Lima, C.A.R.; Moraes, G.H.K.; Nunes, R.V.; Vasconcellos, C.H.F.; Vargas Júnior, J.G. 1,25-Dihidroxivitamina-D 3 Sobre as Características Ósseas de Frangos de Corte Fêmeas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017, 69, 1285–1293, doi:10.1590/1678-4162-9371.
10. Nunes, R.A.; Duarte, M. de S.; Campos, P.H.R.F.; de Oliveira, L.L.; e Silva, F.F.; Kreuz, B.S.; Mirabile, C.G.; Borges, S.O.; Calderano, A.A. Active Vitamin D3-Glycoside Preserves Weight Gain and Modulates the Inflammatory Response in Broiler Chickens Challenged with Lipopolysaccharide. *Anim Feed Sci Technol* 2020, 270, 114704, doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114704.
11. Bassi, L.S.; Moreno, F.A.; Martins, C.C.S.; Sens, R.F.; Lozano-Poveda, C.A.; Maiorka, A. Effect of 25-Hydroxycholecalciferol Supplementation with Different Dietary Available Phosphorus Levels for Broilers. *Br Poult Sci* 2023, 1–8, doi:10.1080/00071668.2023.2278474.
12. Poorhemati, H.; Ghaly, M.; Sadvakassova, G.; Komarova, S. V. FGF23 Level in Poultry Chicken, a Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol* 2023, 14, doi:10.3389/fphys.2023.1279204.
13. Souza, C.S.; Vieites, F.M.; Nunes, R.V.; Brusamarello, E.; Reis, T.L.; Lima, C.A.R. de; Vargas Junior, J.G. de Suplemento de 1,25-Dihidroxicolecalciferol e Redução de Cálcio e Fósforo Disponível Para Frangos de Corte Fêmeas. *Research, Society and Development* 2020, 9, e119973975, doi:10.33448/rsd-v9i7.3975.
14. Hu, Y.; van Baal, J.; Hendriks, W.H.; Resink, J.-W.; Liesegang, A.; van Krimpen, M.M.; Bikker, P. High Dietary Ca and Microbial Phytase Reduce the Expression of Ca Transporters While Enhancing Claudins Involved in Paracellular Ca Absorption in the Porcine Jejunum and Colon. *British Journal of Nutrition* 2023, 129, 1127–1135, doi:10.1017/S0007114522002239.
15. Vieites, F.M.; Brusamarello, E.; Corrêa, G. da S.S.; Souza, C.S.; De Oliveira, C.F.S.; De Moraes, G.H.K.; Caramori Júnior, J.G. 1,25-Dihidroxicolecalciferol de Origem Herbal (*Solanum glaucophyllum*) Mantém o Desempenho e a Qualidade Óssea de Frangos de Corte Fêmeas Durante Restrição de Cálcio e Fósforo. *Archivos de Zootecnia* 2018, 67, 414–419, doi:10.21071/az.v67i259.3799.
16. Warren, M.F.; Vu, T.C.; Toomer, O.T.; Fernandez, J.D.; Livingston, K.A. Efficacy of 1- α -Hydroxycholecalciferol Supplementation in Young Broiler Feed Suggests Reducing Calcium Levels at Grower Phase. *Front Vet Sci* 2020, 7, doi:10.3389/fvets.2020.00245.
17. Han, J.; Wu, L.; Lv, X.; Liu, M.; Zhang, Y.; He, L.; Hao, J.; Xi, L.; Qu, H.; Shi, C.; et al. Intestinal Segment and Vitamin D3 Concentration Affect Gene Expression Levels of Calcium and Phosphorus Transporters in Broiler Chickens. *J Anim Sci Technol* 2022, doi:10.5187/jast.2022.e78.
18. Ismailova, A.; White, J.H. Vitamin D, Infections and Immunity. *Rev Endocr Metab Disord* 2022, 23, 265–277, doi:10.1007/s11154-021-09679-5.
19. Shojadoost, B.; Behboudi, S.; Villanueva, A.I.; Brisbin, J.T.; Ashkar, A.A.; Sharif, S. Vitamin D3 Modulates the Function of Chicken Macrophages. *Res Vet Sci* 2015, 100, 45–51, doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.009.

20. Shojadoost, B.; Yitbarek, A.; Alizadeh, M.; Kulkarni, R.R.; Astill, J.; Boodhoo, N.; Sharif, S. Centennial Review: Effects of Vitamins A, D, E, and C on the Chicken Immune System. *Poult Sci* 2021, *100*, 100930, doi:10.1016/j.psj.2020.12.027.
21. Cao, S.; Li, T.; Shao, Y.; Zhang, L.; Lu, L.; Zhang, R.; Hou, S.; Luo, X.; Liao, X. Regulation of Bone Phosphorus Retention and Bone Development Possibly by Related Hormones and Local Bone-Derived Regulators in Broiler Chicks. *J Anim Sci Biotechnol* 2021, *12*, 88, doi:10.1186/s40104-021-00610-1.
22. Saddoris, K.L.; Fleet, J.C.; Radcliffe, J.S. The Effect of Dietary Vitamin D Supplementation on Sodium-Dependent Phosphate Uptake and Expression of NaPi-IIb in the Small Intestine of Weanling Pigs. *J Anim Sci* 2021, *99*, doi:10.1093/jas/skz106.
23. Gloux, A.; Le Roy, N.; Ezagal, J.; Mème, N.; Hennequet-Antier, C.; Piketty, M.L.; Prié, D.; Benzoni, G.; Gautron, J.; Nys, Y.; 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* 2020, *72*, 106407, doi:10.1016/j.domaniend.2019.106407.
24. Dimitrov, V.; Barbier, C.; Ismailova, A.; Wang, Y.; Dmowski, K.; Salehi-Tabar, R.; Memari, B.; Groulx-Boivin, E.; White, J.H. Vitamin D-Regulated Gene Expression Profiles: Species-Specificity and Cell-Specific Effects on Metabolism and Immunity. *Endocrinology* 2021, *162*, doi:10.1210/endocr/bqaa218.
25. Haussler, M.R.; Livingston, S.; Sabir, Z.L.; Haussler, C.A.; Jurutka, P.W. Vitamin D Receptor Mediates a Myriad of Biological Actions Dependent on Its 1,25-Dihydroxyvitamin D Ligand: Distinct Regulatory Themes Revealed by Induction of Klotho and Fibroblast Growth Factor-23. *JBM R Plus* 2021, *5*, doi:10.1002/jbm4.10432.
26. Souza, C.S.; Vieites, F.M.; Vasconcellos, C.H.F.; Calderano, A.A.; Nunes, R.V.; Ferreira, C.M.; Pereira, T.V.S.; Moraes, G.H.K. Suplemento de 1,25 Dihidroxicolecalciferol e Redução de Cálcio e Fósforo Disponível Para Frangos de Corte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013, *65*, 519–525, doi:10.1590/S0102-09352013000200031.
27. Alves, O. dos S.; Calixto, L.F.L.; Araujo, A.H.B.; Torres-Cordido, K.A.A.; Reis, T.L.; Calderano, A.A. Decreased Levels of Vitamin D₃ and Supplementation with 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Glycoside on Performance, Carcass Yield and Bone Quality in Broilers. *Ciência Rural* 2018, *48*, doi:10.1590/0103-8478cr20170705.
28. Gili, V.; Pardo, V.G.; Ronda, A.C.; De Genaro, P.; Bachmann, H.; Boland, R.; de Boland, A.R. In Vitro Effects of 1 α ,25(OH)₂D₃-Glycosides from Solbone A (*Solanum glaucophyllum* Leaves Extract; Herbonis AG) Compared to Synthetic 1 α ,25(OH)₂D₃ on Myogenesis. *Steroids* 2016, *109*, 7–15, doi:10.1016/j.steroids.2016.03.002.
29. Trautenmüller, H.; Genova, J.L.; Faria, A.B.B. de; Martins, J.S.; Viana, S.C.M.; Castilha, L.D.; Gonçalves, A.C.; Baraldi-Artoni, S.M.; Carvalho, P.L. de O. Bone Traits and Gastrointestinal Tract Parameters of Piglets Fed Cholecalciferol and 1,25-Dihydroxycholecalciferol Glycoside. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2021, *50*, doi:10.37496/rbz5020210098.
30. Yavaş, İ.; Çenesiz, A.A.; Ceylan, N. Effects of Herbal Vitamin D₃ and Phytase Supplementation to Broiler Feed on Performance, Bone Development and Serum Parameters of Broilers. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2020, doi:10.15832/ankutbd.479182.
31. Jacquillet, G.; Unwin, R.J. Physiological Regulation of Phosphate by Vitamin D, Parathyroid Hormone (PTH) and Phosphate (Pi). *Pflugers Arch* 2019, *471*, 83–98, doi:10.1007/s00424-018-2231-z.
32. Wu, L.; Wang, X.; Lv, X.; He, L.; Qu, H.; Shi, C.; Zhang, L.; Zhang, J.; Wang, Z.; Han, J. 1,25-Dihydroxycholecalciferol Improved the Growth Performance and Upregulated the Calcium Transporter Gene Expression Levels in the Small Intestine of Broiler Chickens. *J Poult Sci* 2022, *59*, 0210019, doi:10.2141/jpsa.0210019.
33. Khan, S.H.; Shahid, R.; Mian, A.A.; Sardar, R.; Anjum, M.A. ORIGINAL ARTICLE: Effect of the Level of Cholecalciferol Supplementation of Broiler Diets on the Performance and Tibial Dyschondroplasia. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2010, *94*, 584–593, doi:10.1111/j.1439-0396.2009.00943.x.
34. Colet, S.; Garcia, R.; Almeida Paz, I.; Caldara, F.; Borille, R.; Royer, A.; Nääs, I.; Sgavioli, S. Bone Characteristics of Broilers Supplemented with Vitamin D. *Rev Bras Cienc Avic* 2015, *17*, 325–332, doi:10.1590/1516-635x1703325-332.

35. Nääs, I. de A.; Baracho, M. dos S.; Bueno, L.; Moura, D. de; Vercelino, R. do A.; Salgado, D. Use of Vitamin D to Reduce Lameness in Broilers Reared in Harsh Environments. *Rev Bras Cienc Avic* 2012, 14, 165–172, doi:10.1590/S1516-635X2012000300002.
36. Gil, Á.; Plaza-Díaz, J.; Mesa, M.D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab* 2018, 72, 87–95, doi:10.1159/000486536.
37. Hodnik, J.J.; Ježek, J.; Starič, J. A Review of Vitamin D and Its Importance to the Health of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Research* 2020, 87, 84–87, doi:10.1017/S0022029920000424.
38. Marques, M.; Oliveira, R.; Donzele, J.; Albino, L.; Tizziani, T.; Faria, L.; Muniz, J.; Dalólio, F.; Lozano, C.; Silva, C. 25-Hydroxycholecalciferol As an Alternative to Vitamin D3 in Diets with Different Levels of Calcium for Broilers Reared Under Heat Stress. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2022, doi:10.1590/1806-9061-2021-1559.
39. Kumar, R.; Brar, R.S.; Banga, H.S. Hypervitaminosis D3 in Broiler Chicks: Histopathological, Immunomodulatory and Immunohistochemical Approach. *Iran J Vet Res* 2017, 18, 170–176.
40. Koivisto, O.; Hanel, A.; Carlberg, C. Key Vitamin D Target Genes with Functions in the Immune System. *Nutrients* 2020, 12, 1140, doi:10.3390/nu12041140.
41. Jaime, J.; Vargas-Bermúdez, D.S.; Yitbarek, A.; Reyes, J.; Rodríguez-Lecompte, J.C. Differential Immunomodulatory Effect of Vitamin D (1,25(OH)2D3) on the Innate Immune Response in Different Types of Cells Infected in Vitro with Infectious Bursal Disease Virus. *Poult Sci* 2020, 99, 4265–4277, doi:10.1016/j.psj.2020.06.006.
42. Rodríguez-Lecompte, J.C.; Yitbarek, A.; Cuperus, T.; Echeverry, H.; van Dijk, A. The Immunomodulatory Effect of Vitamin D in Chickens Is Dose-Dependent and Influenced by Calcium and Phosphorus Levels. *Poult Sci* 2016, 95, 2547–2556, doi:10.3382/ps/pew186.
43. Prietl, B.; Treiber, G.; Pieber, T.; Amrein, K. Vitamin D and Immune Function. *Nutrients* 2013, 5, 2502–2521, doi:10.3390/nu5072502.
44. Bachmann, H.; Autzen, S.; Frey, U.; Wehr, U.; Rambeck, W.; McCormack, H.; Whitehead, C.C. The Efficacy of a Standardised Product from Dried Leaves of *Solanum glaucophyllum* as Source of 1,25-Dihydroxycholecalciferol for Poultry. *Br Poult Sci* 2013, 54, 642–652, doi:10.1080/00071668.2013.825692.
45. Vieites, F.M.; Nalon, R.P.; Santos, A.L.; Castelo Branco, P.A.; Souza, C.S.; Nunes, R.V.; Calderano, A.A.; Arruda, N.V.M. de Desempenho, Rendimento de Carcaça e Cortes Nobres de Frangos de Corte Alimentados Com Rações Suplementadas Com *Solanum glaucophyllum*. *Semin Cienc Agrar* 2014, 35, 1617, doi:10.5433/1679-0359.2014v35n3p1617.
46. Kumar, R.; Singh Banga, H.; Singh Brar, R. Effects of Dietary Vitamin D3 Over-Supplementation on Broiler Chickens' Health; Clinicopathological and Immunohistochemical Characteristics. *Journal of Veterinary Physiology and Pathology* 2023, 2, 20–31, doi:10.58803/jvpp.v2i2.21.
47. Pande, V. V.; Chousalkar, K.C.; Bhanugopan, M.S.; Quinn, J.C. Super Pharmacological Levels of Calcitriol (1,25-(OH)2 D3) Inhibits Mineral Deposition and Decreases Cell Proliferation in a Strain Dependent Manner in Chicken Mesenchymal Stem Cells Undergoing Osteogenic Differentiation in Vitro. *Poult Sci* 2015, 94, 2784–2796, doi:10.3382/ps/pev284.
48. Nong, K.; Liu, Y.; Fang, X.; Qin, X.; Liu, Z.; Zhang, H. Effects of the Vitamin D3 on Alleviating the Oxidative Stress Induced by Diquat in Wenchang Chickens. *Animals* 2023, 13, 711, doi:10.3390/ani13040711.
49. Liao, X.D.; Suo, H.Q.; Lu, L.; Hu, Y.X.; Zhang, L.Y.; Luo, X.G. Effects of Sodium, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Parathyroid Hormone Fragment on Inorganic P Absorption and Type IIb Sodium-Phosphate Cotransporter Expression in Ligated Duodenal Loops of Broilers. *Poult Sci* 2017, 96, 2344–2350, doi:10.3382/ps/pex033.
50. Lu, L.; Li, S.M.; Zhang, L.; Liu, X.Q.; Li, D.Y.; Zhao, X.L.; Liu, Y.P. Expression of β -Defensins in Intestines of Chickens Injected with Vitamin D3 and Lipopolysaccharide. *Genetics and Molecular Research* 2015, 14, 3330–3337, doi:10.4238/2015.April.13.12.
51. Zhang, Y.; Leung, D.Y.M.; Richers, B.N.; Liu, Y.; Remigio, L.K.; Riches, D.W.; Goleva, E. Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. *The Journal of Immunology* 2012, 188, 2127–2135, doi:10.4049/jimmunol.1102412.

52. Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Calderano, A.A.; Hanas, M.I.; Sakomura, N.K.; Perazzo, F.; Rocha, G.C.; Saraiva, A.; Abreu, M.L.T.; Genova, J.L.; et al. *Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*; Suprema.; Visconde do Rio Branco, 2024; Vol. 5;.
53. Sakomura, N.K.; Rostagno, S.H. *Métodos de Pesquisa Em Nutrição de Monogástricos*; FUNEP, Ed.; Jaboticabal, 2016; Vol. 2;.
54. Luna, L.G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Pathology*; New York, 1968; Vol. 3.
55. Kisielinski, K.; Willis, S.; Prescher, A.; Klosterhalfen, B.; Schumpelick, V. A Simple New Method to Calculate Small Intestine Absorptive Surface in the Rat. *Clin Exp Med* 2002, 2, 131–135, doi:10.1007/s102380200018.
56. Nunes, R.V.; Broch, J.; Wachholz, L.; de Souza, C.; Damasceno, J.L.; Oxford, J.H.; Bloxham, D.J.; Billard, L.; Pesti, G.M. Choosing Sample Sizes for Various Blood Parameters of Broiler Chickens with Normal and Non-Normal Observations. *Poult Sci* 2018, 97, 3746–3754, doi:10.3382/ps/pey217.
58. Silva, D.J.; Queiroz, A.C. *Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos*; Viçosa, 2006; Vol. 3;.
59. Crenshaw, T.D.; Peo, E.R.; Lewis, A.J.; Moser, B.D. Bone Strength as a Trait for Assessing Mineralization in Swine: A Critical Review of Techniques Involved. *J Anim Sci* 1981, 53, 827–835, doi:10.2527/jas1981.533827x.
60. 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* 2013, 22, 609–627, doi:10.3382/japr.2012-00743.
61. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001, 25, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
62. SAS Institute SAS University Edition: Installation Guide for Windows 2014.
63. Fatemi, S.A.; Elliott, K.E.C.; Bello, A.; Peebles, E.D. Effects of the in Ovo Injection of Vitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D3 in Ross 708 Broilers Subsequently Challenged with Coccidiosis. I. Performance, Meat Yield and Intestinal Lesion Incidence^{1,2,3}. *Poult Sci* 2021, 100, 101382, doi:10.1016/j.psj.2021.101382.
64. Fatemi, S.A.; Elliott, K.E.C.; Macklin, K.S.; Bello, A.; Peebles, E.D. Effects of the In Ovo Injection of Vitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D3 in Ross 708 Broilers Subsequently Challenged with Coccidiosis: II Immunological and Inflammatory Responses and Small Intestine Histomorphology. *Animals* 2022, 12, 1027, doi:10.3390/ani12081027.
65. Fatemi, S.A.; Elliott, K.E.C.; Bello, A.; Durojaye, O.A.; Zhang, H.-J.; Peebles, E.D. The Effects of in Ovo Injected Vitamin D3 Sources on the Eggshell Temperature and Early Posthatch Performance of Ross 708 Broilers, . *Poult Sci* 2020, 99, 1357–1362, doi:10.1016/j.psj.2019.10.055.
66. Kanani, R.; Kianfar, R.; Janmohammadi, H.; Kyun Kim, W.; Olyae, M. Influence of Vitamin D3 and Lactic Acid on Performance, Egg Quality, and Hatchability in Broiler Breeder Hens. *Animal Production Research* 2022, 11, 67–81, doi:10.22124/ar.2022.21551.1683.
67. Setiyaningsih, N.; Jayanegara, A.; Wardani, W.W. Effects of a Vitamins D and C Supplement on Performance, Hatchability and Blood Profiles of Broiler Breeders. *J Worlds Poult Res* 2023, doi:10.36380/jwpr.2023.7.
68. Li, H.-M.; Liu, Y.; Zhang, R.-J.; Ding, J.-Y.; Shen, C.-L. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Osteoarthritis: A Meta-Analysis. *Rheumatology* 2021, 60, 538–548, doi:10.1093/rheumatology/keaa644.
69. San, J.; Zhang, Z.; Bu, S.; Zhang, M.; Hu, J.; Yang, J.; Wu, G. Changes in Duodenal and Nephritic Ca and P Absorption in Hens during Different Egg-Laying Periods. *Heliyon* 2021, 7, e06081, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06081.
70. Barnkob, L.L.; Argyraki, A.; Jakobsen, J. Naturally Enhanced Eggs as a Source of Vitamin D: A Review. *Trends Food Sci Technol* 2020, 102, 62–70, doi:10.1016/j.tifs.2020.05.018.
71. Kanaani, R., R.Kianfar., H.Janmohammadi., W.K.K., M.Olyae. Influence of Vitamin D3 and Lactic Acid on Performance, Egg Quality, and Hatchability in Broiler Breeder Hens. *Animal Production Research* 2022, 11, 67–81.

72. Li, J.; Yuan, J.; Miao, Z.; Guo, Y. Effects of Age on Intestinal Phosphate Transport and Biochemical Values of Broiler Chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016, *30*, 221–228, doi:10.5713/ajas.16.0540.
73. Kermani, Z.A.; Taheri, H.R.; Faridi, A.; Shahir, M.H.; Baradaran, N. Interactive Effects of Calcium, Vitamin D3, and Exogenous Phytase on Phosphorus Utilization in Male Broiler Chickens from 1 to 21 Days Post-Hatch: A Meta-Analysis Approach. *Anim Feed Sci Technol* 2023, *295*, 115525, doi:10.1016/j.anifeedsci.2022.115525.
74. Costa, C.H.R.; Barreto, S.L. de T.; Umigi, R.T.; Lima, H.J.D.; Araujo, M.S. de; Medina, P. Balanço de Cálcio e Fósforo e Estudo Dos Níveis Desses Minerais Em Dietas Para Codornas Japonesas (45 a 57 Semanas de Idade). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2010, *39*, 1748–1755, doi:10.1590/S1516-35982010000800017.
75. Sakkas, P.; Smith, S.; Hill, T.R.; Kyriazakis, I. A Reassessment of the Vitamin D Requirements of Modern Broiler Genotypes. *Poult Sci* 2019, *98*, 330–340, doi:10.3382/ps/pey350.
76. Vieites, F.M.; Drosghic, L.C.A.B.; Souza, C.S.; Lima, C.A.R.; Moraes, G.H.K.; Nunes, R.V.; Vasconcellos, C.H.F.; Vargas Júnior, J.G. 1,25-Dihidroxivitamina-D 3 Sobre as Características Ósseas de Frangos de Corte Fêmeas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017, *69*, 1285–1293, doi:10.1590/1678-4162-9371.
77. Dünghoef, K.; Mirja Rosmarie Wilkens; Nina Mrochen; B. Schröder; Saara Sander; J. Kamphues Effects of an Extra Supply of Vitamin D, Calcium and Phosphorus via Drinking Water on the Calcium and Phosphorus Metabolism in Growing Chickens Fed a Conventional Complete Diet. *European Poultry Science (EPS)* 2014, *78*, doi:10.1399/eps.2014.24.
78. Lv, X.; Hao, J.; Wu, L.; Liu, M.; He, L.; Qiao, Y.; Cui, Y.; Wang, G.; Zhang, C.; Qu, H.; et al. Age Quadratically Affects Intestinal Calcium and Phosphorus Transporter Gene Expression in Broiler Chickens. *Anim Biosci* 2022, *35*, 1921–1928, doi:10.5713/ab.22.0058.
79. Yang, L.-P.; Dong, Y.-P.; Luo, W.-T.; Zhu, T.; Li, Q.-W.; Zhang, L.-J.; Kong, J.; Yuan, Z.-W.; Zhao, Q. Tissue-Specific Regulatory Effects of Vitamin D and Its Receptor on Calbindin-D28K and Calbindin-D9K. *Biochem Mol Biol J* 2018, *04*, doi:10.21767/2471-8084.100072.
80. Christakos, S.; Liu, Y.; Dhawan, P.; Peng, X. The Calbindins: Calbindin-D9K and Calbindin-D28K. In *Vitamin D*; Elsevier, 2005; pp. 721–735.
81. David, L.S.; Anwar, M.N.; Abdollahi, M.R.; Bedford, M.R.; Ravindran, V. Calcium Nutrition of Broilers: Current Perspectives and Challenges. *Animals* 2023, *13*, 1590, doi:10.3390/ani13101590.
82. Silva, J.C.S.; Fernandes, A.W. do N.; Nunes, M.J.M.; Morais, P.L.A. de G.; Fonseca, I.A.T.; Engelberth, R.C.G.J.; Lopes de Paiva Cavalcanti, J.R.; Pessoa de Araújo, D. Regulação Negativa de Calbindina-D28k Durante o Envelhecimento Neural Animal. *Revista Neurociências* 2022, *30*, 1–36, doi:10.34024/rnc.2022.v30.13353.
83. Bolt, M.J.G.; Cao, L.-P.; Kong, J.; Sitrin, M.D.; Li, Y.C. Vitamin D Receptor Is Required for Dietary Calcium-Induced Repression of Calbindin-D9k Expression in Mice. *J Nutr Biochem* 2005, *16*, 286–290, doi:10.1016/j.jnutbio.2004.12.011.

1,25-Dihidroxicolecalciferol glicosídeo nas dietas de matrizes e frangos de corte

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação de 1,25-diidroxicolecalciferol glicosídeo ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$) no desempenho, rendimento de carcaça, cortes, parâmetros bioquímicos sanguíneos, histomorfometria intestinal, saúde óssea e expressão gênica em frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas ou não com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Um total de 1.152 pintos machos Ross 308 AP de um dia de idade foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2×3 . Um fator foi a inclusão ou não do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes de 21 a 62 semanas de idade. O outro fator envolveu três níveis (0,0; 50 e 100 mg/kg) de inclusão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. O estudo totalizou seis tratamentos, com oito repetições e 24 aves por unidade experimental. Os resultados demonstram que a suplementação com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes proporcionou frangos de corte mais pesados ao nascimento e com menores níveis de lesões de discondroplasia tibial e maiores níveis de calbindinas D28K, interleucina 10 e interleucina 1β ao atingirem 42 dias de idade. Além disso, frangos de corte suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ durante o crescimento apresentam menor conversão alimentar, menor profundidade de cripta, maior altura do vilo, maior área de absorção, maior relação vilo: cripta e maior expressão gênica de interleucina 10 e interleucina 1β aos 42 dias de idade. Os resultados de interação entre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes e dos frangos de corte demonstrou que frangos de corte, quando provenientes de matrizes suplementadas, apresentam maiores níveis de fosfatase alcalina, interleucina 10 e interleucina 1β quando suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ aos 42 dias de idade. Conclui-se que frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nascem com ossos mais fortificados, enquanto a suplementação de 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dieta dos frangos de corte durante a fase de crescimento, independente da sua origem, proporciona melhor saúde intestinal e resposta imune, e no fator de interação, proporciona maior resposta imune aos 42 dias de idade.

Palavras-chave: Modulação imunológica, saúde intestinal, Expressão gênica, aves, saúde tibial.

1,25-Dihydroxycholecalciferol glycoside in breeders and broilers diets

Abstract

This study aimed to investigate the effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside (1,25(OH)₂D₃-G) supplementation on performance, carcass yield and cuts, blood biochemical parameters, intestinal histomorphometry, bone health, and gene expression in broilers from breeders supplemented or not with 1,25(OH)₂D₃-G. A total of 1,152 one-day-old male Ross 308 AP chicks were distributed in a completely randomized design with a 2 × 3 factorial arrangement. One factor was the inclusion or not of 1,25(OH)₂D₃-G in the diets of breeders from 21 to 62 weeks of age. The other factor involved three inclusion levels (0.0, 50, and 100 mg/kg) of 1,25(OH)₂D₃-G in the diets of broilers from 1 to 21 days of age. The study comprised six treatments, with eight replicates and 24 birds per experimental unit. The results showed that supplementation with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G in breeder diets resulted in heavier chicks at hatch, lower incidence of tibial dyschondroplasia lesions, and increased levels of calbindin-D28K, interleukin-10 (IL-10), and interleukin-1β (IL-1β) at 42 days of age. Additionally, broilers supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G during the growing phase showed improved feed conversion, reduced crypt depth, increased villus height, greater absorptive area, higher villus:crypt ratio, and increased gene expression of IL-10 and IL-1β at 42 days. The interaction between 1,25(OH)₂D₃-G supplementation in breeder and broiler diets revealed that broilers from supplemented breeders exhibited higher levels of alkaline phosphatase, IL-10, and IL-1β when also supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G at 42 days of age. It can be concluded that broilers from breeders supplemented with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G are born with stronger bones, while supplementation of broiler diets with 100 mg/kg of 1,25(OH)₂D₃-G during the growing phase, regardless of parental origin, promotes better intestinal health and immune response. Moreover, the interaction effect enhances immune response at 42 days of age.

Keywords: Immune modulation, intestinal health, gene expression, poultry, tibial health.

INTRODUÇÃO

A exigência de vitamina D₃ na dieta de frangos de corte pode variar conforme fatores como idade, peso corporal, genética e densidade mineral óssea (Vieites et al., 2018). Além disso, as recomendações sobre a suplementação de vitamina D₃ apresentam controvérsias, refletindo a falta de evidências conclusivas sobre os níveis ideais para otimizar os resultados (Mathis et al., 2016; Nunes et al., 2020; Rostagno et al., 2017). Enquanto algumas diretrizes indicam doses mais altas, outras preferem valores mais conservadores, levando em consideração os potenciais riscos de toxicidade (Pande et al., 2015; Aye Cho et al., 2020; Babazadeh et al., 2022). No entanto, é amplamente reconhecido o papel da vitamina D₃ na regulação do metabolismo de cálcio e fósforo, além de sua importância para a saúde e desempenho dos frangos de corte (Cao et al., 2021; Yu et al., 2022).

O mercado oferece uma ampla gama de opções de vitamina D₃, que vão desde sua forma não hidroxilada, conhecida como colecalciferol, até seus diversos metabólitos, como 25-hidroxicolecalciferol, 1 α -hidroxicolecalciferol e 1,25-dihidroxicolecalciferol (Han et al., 2018; Vieites et al., 2018; Nunes et al., 2020; Haussler et al., 2021; Liu et al., 2023). Dentre esses metabólitos, o 1,25-Dihidroxicolecalciferol se destaca como uma opção para inclusão nas dietas de frangos de corte (Vieites et al., 2017; Trautenmüller et al., 2022). Este composto pode ser encontrado em fontes vegetais, como o *Solanum glaucophyllum*, com uma ligação glicosídica (Vieites et al., 2016; Alves et al., 2018; Wu et al., 2022), possibilitando uma ação prolongada no intestino das aves, devido a necessidade de enzimas quebrarem as moléculas de glicose associadas ao 1,25-Dihidroxicolecalciferol (Hsiao et al., 2018; Shojadoost et al., 2021) de forma mais lenta.

O uso de 1,25- Dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de frangos de corte tem crescido significativamente (Vieites et al., 2017; Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020; Wu et al., 2022), por desempenhar papel fundamental na regulação do metabolismo de cálcio e fósforo, essenciais para fortificação óssea (Vieites et al., 2016; Alves et al., 2018). Além disso, estudos demonstraram que a suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G proporciona efeitos benéficos no sistema imunológico das aves (Kumar et al., 2017; Jaime et al., 2020; Nunes et al., 2020; Ismailova e White, 2022), aumentando a atividade de interleucinas essenciais para o sistema imunológico (Kongsbak et al., 2013; Vazquez et al., 2018; Koivisto et al., 2020; Nunes et al., 2020) e aumenta os níveis de anticorpos e imunoglobulinas nos intestinos, bem como aumento de células T na corrente sanguínea, indicando uma resposta imunológica mais eficaz (Saini et al., 2013; Chen et al., 2021b; Babazadeh et al., 2022).

No entanto, os níveis de suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de frangos de corte e de matrizes ainda não estão bem estabelecidos (Shojadoost et al., 2015, 2021; Vieites et al., 2018; Babazadeh et al., 2022; Rostagno et al., 2024), o que enfatiza a necessidade de melhor compreensão do metabolismo deste composto no organismo dos frangos de corte para prevenir níveis tóxicos e garantir melhorias na saúde intestinal, na resposta imune e no desempenho (Cheng et al., 2004; Vieites et al., 2014, 2016, 2018).

Portanto, a hipótese deste estudo é que matrizes suplementadas com esse metabólito produzem frangos de corte com ossos mais fortes ao nascimento, resultando em um crescimento que acompanha o desempenho e melhora a resposta imunológica das aves. Com isso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ no desempenho, rendimento de carcaça, cortes, histomorfometria intestinal, parâmetros bioquímicos sanguíneos, saúde óssea, e expressão gênica de frangos de corte aos 42 dias de idade, provenientes de matrizes com 62 semanas de idade suplementadas ou não com a mesma vitamina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de Ética

Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - UNIOESTE (Protocolo nº 01/2021) e foram previamente sancionados pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, em conformidade com a Norma nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

Aves, alojamento e delineamento experimental

Dois galpões de matrizes (G1 e G2) foram construídos no município de Pato Branco, Paraná, Brasil, com o objetivo de abrigar 8.000 matrizes de frangos de corte da linha AP95 (Aviagen) com 21 semanas de idade. Os galpões eram idênticos em termos de características físicas, e as práticas de manejo foram padronizadas para ambas. Cada galpão media 175 m x 13 m, foi construído com estrutura metálica, coberta com telhado de Brasilit, e possuía altura de teto de 3 metros, sem isolamento. Os galpões foram equipados com telas e cortinas brancas, além de ventiladores para manter a ventilação por pressão positiva. Os ninhos eram mecânicos, enquanto o sistema de alimentação consistia em alimentadores automáticos, especificamente projetados para matrizes de frangos de corte, e os bebedouros eram do modelo pendular.

As dietas fornecidas às matrizes nos galpões (G1 e G2) eram idênticas, formuladas com milho e farelo de soja para atender às necessidades nutricionais durante todo o período

produtivo (21 a 62 semanas de idade). No entanto, as matrizes de frango de corte do G1 receberam uma dieta farelada suplementada com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na dosagem de 100 mg/kg, a partir das 21 semanas de idade, enquanto as matrizes do G2 receberam uma dieta farelada sem suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$. Tanto as matrizes do G1 quanto G2 foram mantidas nas mesmas condições ambientais, com temperatura e umidade controladas, seguindo práticas padrão de manejo para matrizes de frangos de corte.

Com 62 semanas de idade, os ovos de cada galpão foram coletados separadamente, identificados, selecionados e higienizados. Em seguida, os ovos foram incubados em incubadoras (Jamesway série Platinum) onde permaneceram por um período de 18 dias, mantidos a uma temperatura de 37,5°C e umidade relativa de 60%. Após os 18 dias de incubação, os ovos foram transferidos para os nascedouros, onde permaneceram a uma temperatura de 37,2°C e umidade relativa de 65% até ocorrer a eclosão dos ovos.

Após o nascimento, os pintos de corte de um dia foram sexados e vacinados para as doenças de Marek, Bouda Aviária, Gumboro e bronquite infecciosa no incubatório. Em seguida, foram identificados com base na origem das matrizes, considerando a suplementação ou não de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$, e posteriormente, foram encaminhados ao Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon, Paraná - Brasil.

Um total de 1152 pintos de corte, machos, de um dia, da linhagem Ross 308 AP95, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 3. Um dos fatores considerou a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas das matrizes (0,0 e 100 mg/kg) e o outro, três níveis (0,0; 50 e 100 mg/kg) de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas dos frangos de corte, totalizando seis tratamentos, com oito repetições de 24 aves por unidade experimental. O desempenho, rendimento de carcaça, cortes, histomorfometria intestinal, parâmetros bioquímicos sanguíneos, saúde óssea, e expressão gênica de frangos de corte foram avaliados aos 42 dias de idade.

As aves foram mantidas em um aviário experimental com dimensões de 35 metros de comprimento por 13 metros de largura, dividido em seções contendo múltiplas unidades experimentais. Cada unidade experimental tinha uma área de 1,96 m² e estava equipada com comedouro tubular, bebedouros do tipo *nipple* e piso de concreto. O controle da temperatura ambiente foi realizado pelo painel Smaai IV, que operava a fornalha de aquecimento a pellets, os quatro exaustores e os painéis evaporativos. O programa de iluminação seguiu as diretrizes do manual da linhagem. A refrigeração do ambiente e a renovação do ar eram asseguradas pelos exaustores e painéis evaporativos. As temperaturas média, mínima e máxima, assim como a

umidade relativa, foram monitoradas diariamente e mantidas dentro da faixa de conforto térmico recomendada para cada fase.

Dietas e manejo alimentar

As dietas experimentais (Tabela 1) foram isonutritivas e isocalóricas, à base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2017). O uso de 1,25(OH)₂D₃-G substituiu o material inerte na ração. O 1,25(OH)₂D₃-G foi fornecido apenas até os 21 dias de idade. Após esse período, os frangos de corte receberam as mesmas dietas de crescimento e terminação sem 1,25(OH)₂D₃-G. Durante todo o período experimental (1 a 42 dias), as aves tiveram acesso *ad libitum* à água e à ração.

Tabela 5. Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Terminação
Milho (7,88%)	504,76	525,03	589,79	645,33
Farelo de soja (46%)	423,88	402,13	333,75	286,41
Óleo de soja degomado	29,70	33,66	39,07	36,54
Fosfato bicálcico	17,86	16,37	15,04	11,34
Calcário calcítico	9,39	8,64	8,62	7,16
Sal comum	4,02	3,68	3,36	3,37
Bicarbonato de sódio	1,00	1,50	2,00	2,00
Lisina sulfato (60%)	1,70	1,75		
Lisina sulfato (54,7%)			2,20	2,43
DL-Metionina (99%)	3,27	3,09	2,58	2,23
L-Treonina (99%)	0,47	0,42	0,31	0,24
Cloreto de colina (60%)	0,50	0,50	0,50	0,45
Adsorvente ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix vitamínico ²	1,30	1,00	1,00	1,00
Premix mineral ³	0,50	0,50	0,50	0,50
Coccidiostático ⁴	0,55	0,55	0,20	
Enramicina ⁵		0,08	0,08	
Inerte (caulim) ⁶	0,10	0,10		
Energia metab. (kcal kg ⁻¹)	3000	3050	3150	3200
Proteína bruta (g kg ⁻¹)	240,471	231,848	205,060	187,327
Lisina digestível (g kg ⁻¹)	13,000	12,50	11,000	10,000
Met. + Cist. digestível (g kg ⁻¹)	9,620	9,250	8,140	7,400
Treonina digestível (g kg ⁻¹)	8,580	8,250	7,260	6,600
Valina digestível (g kg ⁻¹)	10,000	9,630	8,470	7,700
Trp. digestível (g kg ⁻¹)	2,804	2,688	2,323	2,077
Arginina digestível (g kg ⁻¹)	15,196	14,573	12,619	11,302
Cálcio (g kg ⁻¹)	9,500	8,780	8,220	6,610
Fósforo disponível (g kg ⁻¹)	4,500	4,190	3,840	3,090
Sódio (g kg ⁻¹)	2,000	2,000	2,000	2,000
Potássio (g kg ⁻¹)	9,372	9,039	7,995	7,306

¹Adisorvente – bentonita. ²Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta na ração pré-inicial: Vitamina A (min) 14.300 U.I.; Vitamina D₃ (min) 5.200 U.I.; Vitamina E (min) 71,50 U.I.; Vitamina K₃ (min) 3,90 mg; Vitamina B₁ (min) 2,99 0mg; Vitamina B₂ (min) 9,10 mg; Ácido pantotênico (min) 15,60 mg; Vitamina B₆ (min) 5,20 mg; Vitamina B₁₂ (min) 32,50 mg; Ácido nicotínico (min) 78,00 mg; Ácido fólico (min) 2,60 mg; Biotina (min) 0,33 mg; Selênio (min) 0,39 mg. Suplemento vitamínico, composição por kg de dieta nas dietas inicial, crescimento e terminação: Vitamina A 11.000 UI;

Vitamina D₃ 4.000 UI; Vitamina E 55 UI; Vitamina K₃ 3,00 mg; Tiamina (B₁) 2,30 mg; Riboflavina (B₂) 7,00 mg; Piridoxina (B₆) 4,00 mg; Cianocobalamina (B₁₂) 25,00 mg; Ácido pantotênico (B₅) 12,00 mg; Niacina (B₃) 60,00 mg. Ácido fólico (B₉) 2,00 mg. Biotina (B₇) 0,25 mg. Selênio 0,30 g. ³Suplemento mineral, composição por kg de dieta: Ferro (min) 50g; Cobre (min) 10g; Manganês (min) 65g; Zinco (min) 65g; Iodo (min) 1000 mg. ⁴Anticoccidiano: de 1 a 21 dias de idade utilizado salinomicina 12% (Coxistac 12%) e de 22 a 35 dias de idade salinomicina 24% (Salinocox 24%). ⁵Enramicina 8% (Enradin 8%). ⁶Inerte a base de caulim, sendo a inclusão do 1,25(OH)₂D₃-G em função da substituição de peso por peso pelo inerte.

Tratamentos e descrição do produto

Os tratamentos utilizados para o crescimento dos frangos de corte, provenientes de matrizes não suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G, consistiram na inclusão de 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na ração. Para os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, os tratamentos consistiram na adição de 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G. A vitamina utilizada neste estudo (1,25(OH)₂D₃-G) era proveniente do Panbonis® 10, produzido a partir de *Solanum glaucophyllum* na forma de pó, padronizado com amido de trigo pré-gelatinizado e farelo de trigo. Sua composição analítica inclui 1,25(OH)₂D₃-G (mínimo de 10 ppm), umidade (máximo de 14%), proteína bruta (14-18%), fibra bruta (5,25-8,75%), gordura bruta (3-6%), cinza bruta (3-6%), sódio (0,0-0,7%), lisina (0,6-0,9%) e metionina (0,2-0,4%).

Desempenho, rendimento de carcaça, cortes e órgãos

As aves e a ração foram pesadas no início do período experimental e aos 42 dias de idade para determinar o consumo médio de ração, o ganho de peso corporal e a conversão alimentar. A mortalidade foi registrada diariamente para ajustar o consumo de ração e a conversão alimentar (Sakomura and Rostagno, 2016).

Aos 42 dias de idade, três aves por unidade experimental, foram selecionadas aleatoriamente, pesadas, identificadas e eutanasiadas, por eletronarcolese seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração. As carcaças foram inicialmente pesadas, em seguida, foram resfriadas em água e gelo por 60 minutos e submetidas a um período de gotejamento de 10 minutos, para remover o excesso de água. Posteriormente, as carcaças resfriadas foram pesadas para calcular o rendimento da carcaça fria. Em seguida, foram espostejadas, separando-se as pernas (coxa e sobrecoxa), asas, filé de peito e sassami, sendo cada corte pesado individualmente.

O rendimento da carcaça foi calculado a partir do peso da carcaça em relação ao peso vivo da ave. Já o rendimento dos cortes foi determinado com base no peso dos cortes em relação ao peso da carcaça fria. O fígado e a gordura abdominal (constituída pelo tecido adiposo

presente ao redor da cloaca, moela, pro ventrículo e dos músculos abdominais adjacentes) foram separados e pesados para determinar o peso relativo dos mesmos em função do peso vivo da ave.

Histomorfometria intestinal

Aos 42 dias de idade, duas aves por unidade experimental foi eutanasiada por deslocamento cervical para retirada do aparelho digestório para avaliação da morfometria intestinal (altura de vilosidade, profundidade de cripta, área de absorção e relação vilo: cripta). O intestino delgado foi exposto e o jejuno foi separado para a amostragem. No jejuno, o segmento foi da porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Coletou-se um fragmento de 2 cm do jejuno, a 5 cm antes do divertículo de Meckel. Esse fragmento foi fixado em solução de formalina tamponada (10%), desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em parafina. Em seguida, cortes semisseriados de 5 µm de cada segmento foram dispostos em lâminas de vidro e corados utilizando a técnica de hematoxilina-eosina, conforme descrito por (Kisielinski et al., 2002).

As medições foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE 4.1. Em cada lâmina, foram registrados o comprimento e a largura dos vilos, assim como a profundidade e a largura das criptas. Essas medidas morfométricas foram utilizadas para calcular a área da superfície de absorção da mucosa intestinal, seguindo a fórmula descrita por (Luna, 1968). Com os resultados de altura de vilo e profundidade de cripta foi calculada a relação vilo:cripta.

Perfil bioquímico sanguíneo

Aos 42 dias de idade, dois frangos de corte próximos ao peso médio de cada repetição foram selecionados aleatoriamente para a coleta de sangue (4 mL) por punção da veia ulnar, enquanto as aves estavam posicionadas em decúbito lateral. As amostras foram analisadas para cálcio, fósforo, lactato desidrogenase, creatina fosfoquinase e fosfatase alcalina. Para a coleta, foram utilizados tubos a vácuo específicos com ativador de coágulo e capacidade de 5 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil), além de adaptadores e agulhas de 25 x 0,8 mm (Labor Import, Shandong Weigao, China). Após a coleta, as amostras foram mantidas em posição horizontal por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas (K14-4000, Kasvi, Paraná, Brasil) a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a separação do soro, as amostras foram devidamente identificadas, transferidas para microtubos de 2 mL (CRAL, Cotia, São Paulo, Brasil) e armazenadas em um freezer a -20°C até o momento da análise (Nunes et al., 2018).

Para as leituras, as amostras foram descongeladas sob refrigeração a 4°C e mantidas no refrigerador por no máximo 8 horas. Antes da análise, foram centrifugadas em uma microcentrífuga (Eppendorf®, modelo Minispin®, Hamburgo, Alemanha) a 1050 g por 10 minutos à temperatura ambiente para remoção de eventuais traços de fibrina. Os parâmetros bioquímicos foram mensurados utilizando um analisador bioquímico automático com espectrofotometria, especificamente o Flexor EL200 (marca Elitech®, modelo Flexor EL200, Puteaux, França). A análise foi conduzida com reagentes, calibradores (Elical II) e padrões de controle (Elitol I) da marca Elitech®.

Resistencia tibial e sua composição

A tibia direita dos frangos de corte eutanasiados aos 42 dias de idade foi utilizada para determinar a matéria seca em estufa com circulação de ar (105°C). Após esse processo, as tíbias foram calcinadas por 8 horas em um forno mufla a 600°C para obter a matéria mineral (cinzas). Os teores de cálcio e fósforo no osso foram determinados utilizando a metodologia descrita por (Silva and Queiroz, 2006). A concentração de cálcio foi medida por espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS), e o fósforo (P) foi medido por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS). A tibia esquerda foi utilizada para determinar a resistência óssea utilizando o analisador de textura Brookfield CT3. Este equipamento possui uma base que suporta as áreas epifisárias do osso, aplicando uma força de 5 mm/s com uma carga de 200 kgf na região central do osso (diáfise). Os resultados foram expressos em quilograma-força (kgf) (Crenshaw et al., 1981).

Discondroplasia tibial

Aos 42 dias de idade, após a avaliação da resistência óssea, a tibia esquerda foi utilizada para avaliar os graus de discondroplasia tibial, seguindo o método descrito por (Edwards, 1989). Foi feito um corte transversal na parte superior da tibia para expor a porção central do osso, a fim de avaliar os escores das lesões de acordo com o grau de cartilagem:

- 0: Cartilagem normal, estreita e com pequenas irregularidades;
- 1: Cartilagem espessada ou com irregularidades consideráveis;
- 2: Cartilagem espessada, com evidência de cartilagem pré-hipertrófica que não está calcificada e não foi invadida por vasos da metáfise, irregularidades profundas dessa cartilagem são aparentes;
- 3: Grande massa de cartilagem na extremidade proximal da tibia.

Expressão gênica

Aos 42 dias de idade, uma ave por unidade experimental recebeu estímulo através da administração intraperitoneal de 1 mg de LPS (lipopolissacarídeos de *E. coli*, Sigma) por peso corporal. Após 4 horas, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, imediatamente, um fragmento do jejuno foi coletado e imerso na solução estabilizadora RNAlater™ (Invitrogen, EUA), que foi posteriormente armazenada em um freezer a -20°C até a extração de RNA.

O RNA total foi extraído utilizando o *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen GmbH, Germany). Aproximadamente 70 mg de intestino de frango foi pesado, triturado e adicionado em microtubo, livre de DNase e RNase, contendo 500 µL de Trizol. As amostras foram homogeneizadas (vórtex), incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 100 µl de clorofórmio foi adicionado, seguido de homogeneização manual por 15 segundos. Após isso, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugada por 15 minutos a $12.000 \times g$, a 4°C.

A fase aquosa foi coletada em novo tubo, e adicionado 250 µl de isopropanol, seguido por incubação por 10 minutos (temperatura ambiente) com homogeneização manual e centrifugação por 15 minutos a $12000 \times g$, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a $7500 \times g$ por 5 minutos, e o sobrenadante descartado para a secagem do *pellet*, por 15 minutos, e então ressuspendidas em água ultrapura livre de DNase e RNase e incubadas a 60°C por 15 minutos.

A concentração de RNA para as interleucinas (IL-1β e IL-10), calbindina-D28K (CALB-D28K) e β-actina (gene para controle endógeno) foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA), no comprimento de onda de 260/280 nm, e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Safe™ DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) e visualizada em aparelho transiluminador com luz ultravioleta.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com as normas do fabricante, considerando 1 µg de RNA e volume final de 20 µL. Para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, cada amostra foi tratada com 2 µL de *gDNA Wipeout Buffer* (Qiagen GmbH, Germany) e incubada a 45°C por 2 min. Após remoção do DNA genômico, foi adicionado 4 µL *Quantiscript RT Buffer*, 1 µL *RT Primer Mix Reverse Transcription Mix* e 1 µL *Quantiscript Reverse Transcriptase*. A reação de transcriptase reversa foi incubada por 15 min a 42°C, seguida de 95°C por 3 min, sendo imediatamente colocada no gelo. As amostras foram mensuradas utilizando o

espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Os *primers*/oligonucleotídeos utilizados nas reações foram obtidos a partir de trabalhos publicados de *Gallus gallus* (Tabela 2). As sequências dos *primers* foram alinhadas utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O gene da β -actina foi considerada como gene de referência/*housekeeping*, e sua estabilidade entre os tratamentos foi avaliada utilizando o programa *Statistica*® 7.0.

Tabela 2. Genes e sequências de primers.

Gene	Sequência de primers (5'→3')	Tamanho do amplicon (bp)	Referências
β -actina	F: TTCTTTTGGCGCTTGACTCA R: GCGTTCGCTCCAACATGTT	88	Proszkowiec-Weglarz <i>et al.</i> (2019)
CALB-D28K	F: TTGGCACTGAAATCCCACTGAA R: CATGCCAAGACCAAGGCTGA	116	NM_205513.2
IL-1 β	F: GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG R: TGTCGATGTCCCGCATGA	80	NM_204524.2
IL-10	F: CATGCTGCTGGGCCTGAA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	94	NM_001004414.4

Nota: CALB-D28K: Calbindina D28K; IL-1 β : Interleucina1 beta; IL-10: Interleucina 10.

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada *primer*, foi realizado diluições seriadas do *pool* de amostras de cDNA contendo todos os tratamentos, utilizando diferentes concentrações dos iniciadores. Para β -actina, CALB-D28K e IL-10 foi considerado 200 ng de cDNA e 400 nM de *primer*, e para IL-1 β , 200 ng cDNA e 600 nM de *primer*. As análises de qRT-PCR foram conduzidas em Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germany), utilizando o *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* (Qiagen GmbH, Germany) em duplicatas. O volume total da reação foi de 20 μ l. As condições de amplificação foram: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 seg, e 60°C por 10 seg. A curva de dissociação (*melt curve*) dos produtos da reação foi obtida, para determinar a especificidade das reações. Os dados de expressão gênica relativa foram registrados como valores de Ct (cycle threshold) e foram normalizados utilizando a média dos valores de Ct obtidos para o gene de referência em cada amostra, para cada tratamento e para cada gene alvo, conforme recomendado por (Livak and Schmittgen, 2001). O método $2^{-\Delta Ct}$ foi usado para quantificação relativa da expressão gênica (expressa como unidades arbitrárias, AU).

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade residual utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de Levene, ambos realizados por meio do procedimento Univariate. Para os dados com distribuição normal, foi realizada uma análise de variância de dois fatores (ANOVA) para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes e frangos de corte, bem como as possíveis interações entre esses fatores. Quando efeitos significativos foram detectados, as médias dos tratamentos para as matrizes foram comparadas utilizando o teste F, enquanto as médias dos tratamentos para os frangos de corte foram comparadas utilizando o teste de Student-Newman-Keuls.

Essas análises foram conduzidas utilizando o procedimento GLM. Para os dados que não apresentaram distribuição normal (discondroplasia tibial), foram aplicados testes não paramétricos. Na avaliação da incidência de lesões, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes e frangos de corte, seguido pelo teste de Dunn para comparações das médias, utilizando o procedimento NIPARWAY.

Para avaliar as interações entre matrizes e frangos de corte para dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Friedman por meio do procedimento FREQ. O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar os efeitos da suplementação com 1,25(OH)₂D₃-G em matrizes e frangos de corte nos diferentes graus de lesão tibial, sendo os testes realizados com o procedimento FREQ. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SAS, com nível de significância de 5%, e 10% quando necessário (SAS, 2014).

RESULTADOS

Desempenho

Os parâmetros de desempenho dos frangos de corte aos 42 dias de idade não mostraram interação significativa ($P > 0,05$) entre os efeitos da suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e nos frangos de corte. No entanto, matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G produziram pintinhos mais pesados ao nascimento ($P < 0,001$) (Tabela 3). A suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas dos frangos de corte durante o crescimento resultou em menor consumo de ração ($P < 0,023$) nos frangos suplementados com 50 mg/kg e em menor conversão alimentar ($P < 0,003$) naqueles suplementados com 50 e 100 mg/kg.

Tabela 3. Peso inicial médio e desempenho de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	PIM (g)	CRM (g)	GPM (g)	CA (g/g)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	47,73 ^b	4858	3166	1,535
100	48,48 ^a	4821	3165	1,524
Vit D ₃ Frangos				
0,0	48,12	4886 ^A	3159	1,547 ^B
50	48,14	4800 ^B	3159	1,520 ^A
100	48,06	4833 ^{AB}	3179	1,521 ^A
¹ EPM	0,53	85,31	63,50	0,02
<i>P</i> valor				
Vit D ₃ Matrizes	0,001	0,140	0,937	0,112
Vit D ₃ Frangos	0,893	0,023	0,605	0,003
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,737	0,383	0,603	0,896

Vit D₃: Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); PIM: Peso inicial médio; CRM Consumo de ração médio; GPM: Ganho de peso médio; CA: Conversão alimentar; EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Rendimento de carcaça, cortes e órgãos

O rendimento de carcaça, cortes e o peso relativo dos órgãos dos frangos de corte aos 42 dias de idade não apresentaram interação significativa ($P > 0,05$) entre os efeitos da suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e sua suplementação nas dietas dos frangos de corte (Tabela 4). No entanto, a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes resultou em frangos com maior peso relativo do fígado aos 42 dias de idade ($P < 0,022$), em comparação com aqueles provenientes de matrizes não suplementadas. Além disso, a suplementação de 50 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta dos frangos de corte durante o crescimento levou a um maior percentual de gordura abdominal aos 42 dias de idade, em comparação com frangos que não receberam suplementação ($P < 0,035$).

Tabela 4. Rendimento de carcaça, cortes e peso relativo dos órgãos de frangos de corte abatidos aos 42 dias de idade, alimentados com dietas suplementadas ou não com 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	RC (%)	RP (%)	RP (%)	FP (%)	RA (%)	PRF (%)	PRGA (%)
Vit D ₃ Matrizes							
0,0	70,00	30,26	28,83	5,59	8,73	2,11 ^b	1,11
100	69,98	30,39	28,89	5,47	8,79	2,23 ^a	1,16
Vit D ₃ Frangos							
0,0	70,25	30,41	28,86	5,42	8,67	2,14	1,04 ^B
50	69,76	30,13	28,94	5,55	8,85	2,20	1,21 ^A
100	69,96	30,43	28,78	5,63	8,76	2,18	1,15 ^{AB}
¹ EPM	1,47	1,86	1,31	0,48	0,55	0,31	0,32
<i>P</i> valor							
Vit D ₃ Matrizes	0,913	0,523	0,802	0,128	0,497	0,022	0,288
Vit D ₃ Frangos	0,268	0,374	0,855	0,096	0,303	0,607	0,035
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,964	0,937	0,861	0,595	0,770	0,329	0,790

Vit D₃: Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); RC: Rendimento de carcaça; RP: Rendimento de pernas (coxa e sobrecoxa); BY: Rendimento de peito; FP: Filé de peito (sassami); RA: Rendimento de asas; PRGA: Peso relativo de gordura abdominal; PRF: Peso relativo do fígado; EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

Histomorfometria intestinal

A profundidade das criptas ($P < 0,039$), a área de absorção ($P < 0,028$) e a relação vilosidade: cripta ($P < 0,016$) no jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade apresentaram interação entre os efeitos da suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e sua suplementação nas dietas dos frangos de corte (Tabela 5). Além disso, a suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G ao longo do crescimento dos frangos resultou no aumento da altura das vilosidades ($P < 0,001$), da área de absorção ($P < 0,030$) e da relação vilosidade: cripta ($P < 0,002$), além de proporcionar redução na profundidade das criptas ($P < 0,002$).

A interação entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes e dos frangos resultou em menor profundidade das criptas no jejuno dos frangos aos 42 dias de idade (Figura 1). Esse efeito foi mais pronunciado em frangos que receberam 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta ($P < 0,017$) e eram provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G. Os resultados de interação entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e nos frangos resultou em menor área de absorção (Figura 2) e menor relação vilosidade: cripta (Figura 3) em frangos provenientes de matrizes suplementadas em comparação com aqueles provenientes de matrizes não suplementadas.

Tabela 5. Histomorfometria do jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Altura do vilo (μm)	Profundidade da cripta (μm)	Área de absorção (μm ²)	Vilo: Cripta (μm)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	1474,43 ^a	150,74	15,08 ^a	9,80 ^a
100	1105,94 ^b	149,07	11,69 ^b	7,65 ^b
Vit D ₃ Frangos				
0,0	1352,09 ^A	152,31 ^A	13,72 ^{AB}	8,91 ^A
50	1190,43 ^B	152,01 ^A	12,66 ^B	7,89 ^B
100	1328,04 ^A	145,09 ^B	13,79 ^A	9,36 ^A
¹ EPM	119,98	6,11	1,30	0,88
<i>P</i> valor				
Vit D ₃ Matrizes	0,001	0,214	0,001	0,001
Vit D ₃ Frangos	0,001	0,002	0,030	0,002
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,314	0,039	0,028	0,016

Vit D₃: Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); EPM: Erro padrão da média. ^{ab}: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância; ^{AB}: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de significância.

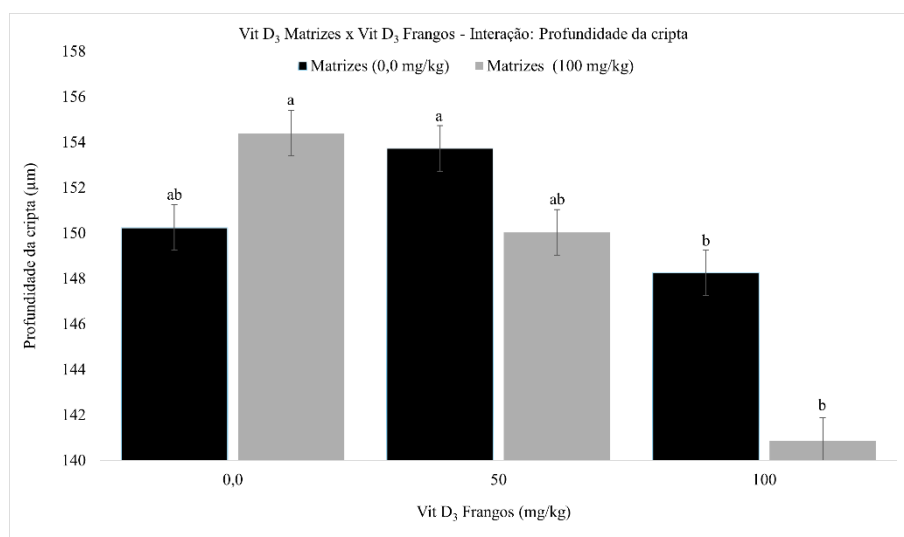


Fig. 1. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na profundidade das criptas no jejuno de frangos de dietas aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Frangos suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com o mesmo aditivo (*P* < 0,044). Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo (*P* < 0,017).

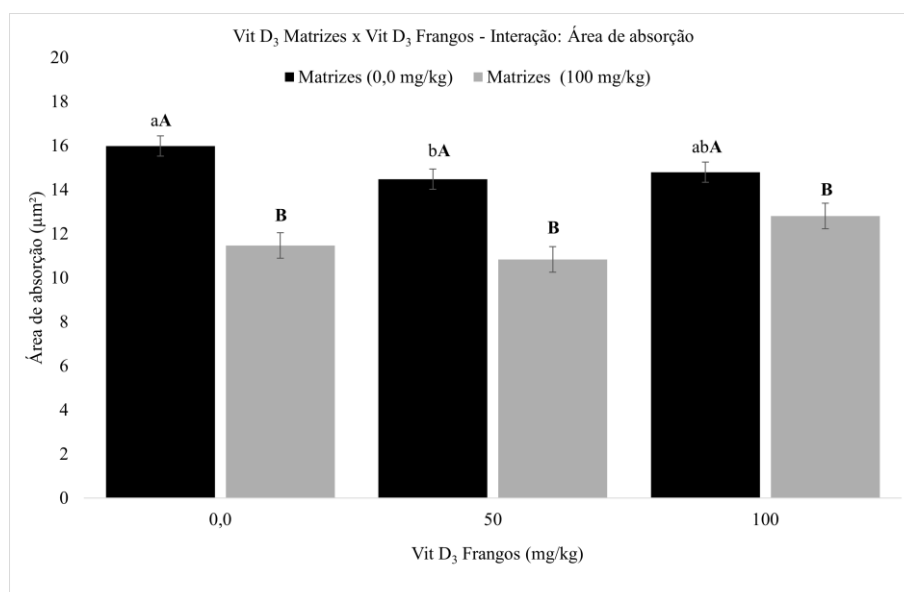


Fig. 2. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na área de absorção no jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,014$). Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo ($P < 0,058$). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas e suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,001$, $P < 0,002$ e $P < 0,001$, respectivamente).

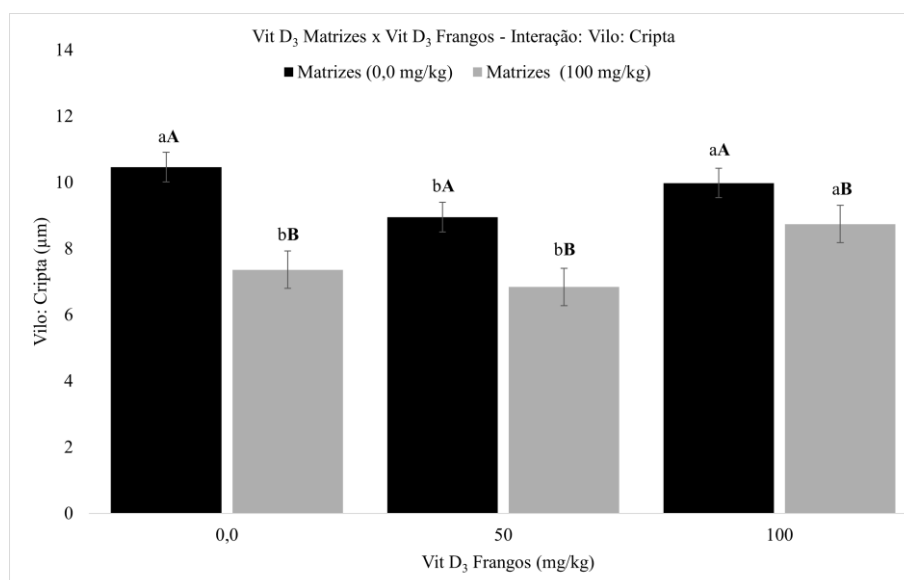


Fig. 3. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na relação vilo: cripta no jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,001$). Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo ($P < 0,001$). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes

de matrizes não suplementadas e suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,001$, $P < 0,002$ e $P < 0,005$, respectivamente).

Perfil bioquímico sanguíneo

As concentrações de fosfatase alcalina ($P < 0,014$) em frangos de corte aos 42 dias de idade apresentaram interação entre os efeitos da suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G nas matrizes e sua suplementação nas dietas dos frangos de corte (Figura 4). Além disso, a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G nas dietas das matrizes resultou em maiores concentrações de creatina fosfoquinase ($P < 0,003$) nos frangos de corte aos 42 dias de idade (Tabela 6). Ao analisar a interação entre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G nas matrizes e nos frangos, observou-se maior atividade da fosfatase alcalina em frangos suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G, provenientes de matrizes suplementadas com o mesmo composto ($P < 0,015$

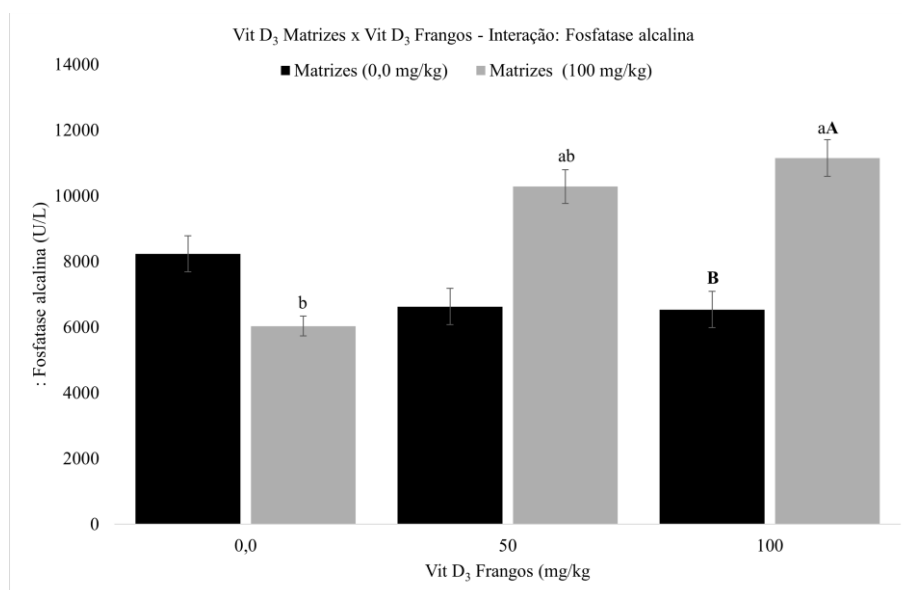


Fig. 4. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na fosfatase alcalina no jejuno sanguíneo dos frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Frangos suplementados com 0,0, 50 e 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo ($P < 0,015$). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G, provenientes de matrizes não suplementadas e suplementadas com o mesmo aditivo ($P < 0,012$).

Tabela 6. Concentrações de cálcio e fósforo e atividade enzimática sérica de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	LDH (U/L)	CPK (U/L)	FA (U/L)
Vit D ₃ Matrizes					
0,0	9,83	4,89	1050	18244 ^b	7136 ^b
100	9,64	4,84	1338	27662 ^a	8978 ^a
Vit D ₃ Frangos					
0,0	9,16	4,75	1241	25390	7063
50	10,13	4,89	1311	23706	8580
100	9,85	4,94	1010	19764	8671
¹ EPM	1,23	0,61	487	10580	3198
<i>P</i> valor					
Vit D ₃ Matrizes	0,789	0,749	0,053	0,003	0,046
Vit D ₃ Frangos	0,625	0,715	0,245	0,313	0,335
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,467	0,588	0,829	0,179	0,014

Vit D₃: Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); EPM: Erro padrão da média. Ca: Cálcio; P: Fósforo; LDH: Lactato desidrogenase; CPK: Creatina fosfoquinase; FA: Fosfatase alcalina. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%. ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Resistência a quebra da tíbia e sua composição

A resistência à quebra da tíbia ($P > 0,929$) e os teores de matéria seca ($P > 0,178$), cálcio ($P > 0,834$) e fósforo ($P > 0,263$) na composição da tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade não apresentaram interação com a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas das matrizes e dos frangos de corte (Tabela 7). Além disso, frangos provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram menor teor de matéria seca na composição da tíbia ($P < 0,013$).

Tabela 7. Resistência à fratura da tíbia e composição bromatológica da tíbia expressa em matéria seca de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	RQT (kgf)	MS (%)	Ca (%)	P (%)
Vit D ₃ Matrizes				
0,0	44,97	44,45 ^a	17,73	8,74
100	45,32	45,48 ^b	17,21	8,95
Vit D ₃ Frangos				
0,0	43,81	44,79	17,38	8,92
50	45,70	45,17	16,83	8,71
100	45,97	44,96	18,19	8,91
¹ EPM	8,94	1,32	1,84	0,59
<i>P</i> valor				

Vit D ₃ Matrizes	0,833	0,013	0,336	0,202
Vit D ₃ Frangos	0,442	0,699	0,123	0,547
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,929	0,178	0,834	0,263

Vit D₃: Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); EPM: Erro padrão da média. RQT: Resistência a quebra da tíbia; MS: Matéria seca. Ca: Cálcio; P: Fósforo. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%.

Discondroplasia tibial

Os frangos de corte provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram menor escore médio de lesões tibiais ($P < 0,014$) e maior taxa de isenção de lesões tibiais ($P < 0,042$) aos 42 dias de idade, em comparação com frangos de matrizes não suplementadas. No entanto, a suplementação com 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta dos frangos de corte durante todo o crescimento, independentemente da origem, resultou em um maior escore médio de lesões tibiais ($P < 0,001$) e em uma maior incidência de lesões leves ($P < 0,016$) aos 42 dias de idade (Tabela 8).

Tabela 8. Discondroplasia tibial em frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Grau das lesões tibiais				
	Escore Médio	Isento (%)	leve (%)	Moderado (%)	Severo (%)
Vit D ₃ Matrizes					
0,0	0,64 ^a	50,00 ^b	38,89	8,33	2,78
100	0,38 ^b	66,67 ^a	29,17	4,17	0,00
Vit D ₃ Frangos					
0,0	0,23 ^b	79,17 ^A	18,75 ^B	2,08	0,00
50	0,63 ^a	45,84 ^B	45,84 ^A	8,33	0,00
100	0,67 ^a	50,00 ^B	37,50 ^A	8,33	4,17
<i>P</i> valor					
Vit D ₃ Matrizes	0,014	0,042	0,218	0,301	0,154
Vit D ₃ Frangos	0,001	0,001	0,016	0,344	0,131
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,096	-	-	-	-

Vit D₃: vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%; ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

Expressão gênica

A expressão gênica de interleucina 10 ($P < 0,012$) e interleucina 1 β ($P < 0,048$) no jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade apresentou interação entre os efeitos da suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e sua suplementação nas dietas dos frangos de corte. Além disso, a suplementação com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G ao longo do crescimento dos frangos resultou em níveis aumentados de interleucina 10 ($P < 0,001$) e interleucina 1 β ($P < 0,004$) no

jejuno dos frangos, quando comparado aos outros tratamentos (Tabela 9). Ao analisar a interação entre a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes e nos frangos, a inclusão de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta de frangos provenientes de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G resultou na maior expressão de interleucina 10 (P < 0,001) e interleucina 1β (P < 0,002) no jejuno aos 42 dias de idade, em comparação com frangos que receberam o mesmo nível de 1,25(OH)₂D₃-G, mas eram de matrizes não suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G (Figuras 5 e 6).

Tabela 9. Expressão gênica no jejuno de frangos de corte com 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas ou não com vitamina D₃, provenientes de matrizes suplementadas ou não com o mesmo aditivo.

Vit D ₃ (mg/kg)	Calbindina D28K	Interleucina 10	Interleucina 1β
Vit D ₃ Matrizes			
0,0	0,380 ^b	1,785 ^b	1,319 ^b
100	0,461 ^a	2,070 ^a	1,512 ^a
Vit D ₃ Frangos			
0,0	0,414	1,863 ^B	1,356 ^B
50	0,403	1,781 ^B	1,295 ^B
100	0,444	2,133 ^A	1,586 ^A
¹ EPM	0,06	0,12	0,16
P valor			
Vit D ₃ Matrizes	0,001	0,001	0,001
Vit D ₃ Frangos	0,263	0,001	0,004
Vit D ₃ Matrizes x Vit D ₃ Frangos - Interação	0,617	0,012	0,048

Vit D₃: vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃-G); ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste F com significância de 5%; ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste Student-Newman-Keuls com significância de 5%.

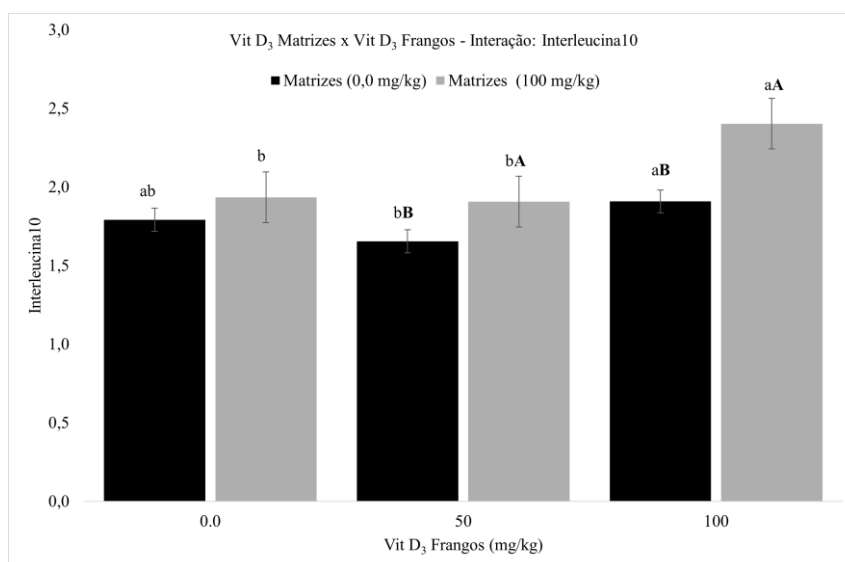


Fig. 5. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na expressão gênica de interleucina 10 no jejuno de frangos

de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. ^{ab}: Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas com o mesmo aditivo (P < 0,043). Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo (P < 0,001). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas e suplementadas com o mesmo aditivo (P < 0,010 e P < 0,001, respectivamente).

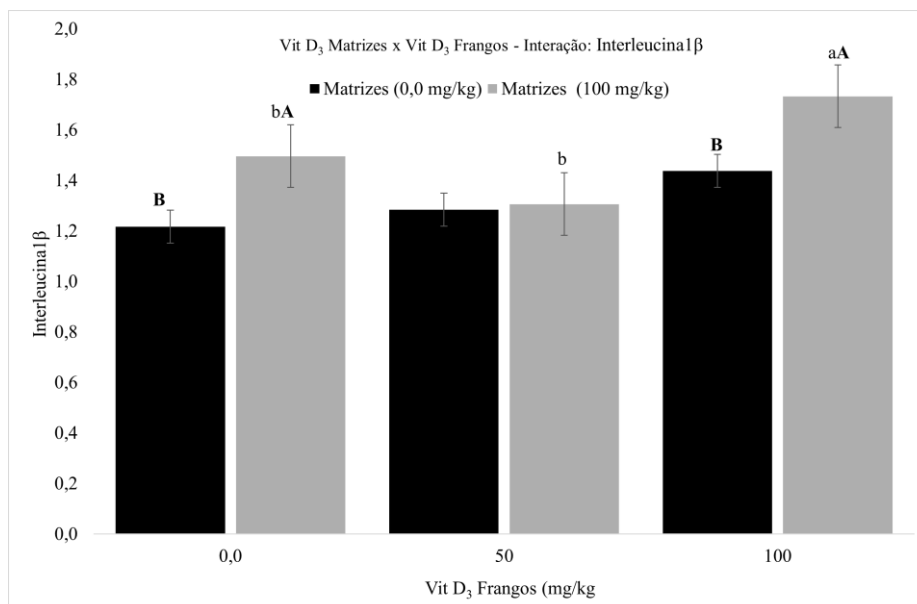


Fig. 6. Análise da interação entre a suplementação de vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃-G) nas dietas de matrizes e frangos de corte e seu impacto na expressão gênica de interleucina 1β no jejuno de frangos de corte aos 42 dias de idade. ^{ab}: Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Student-Newman-Keuls a 10%. Frangos suplementados com 0,0; 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes suplementadas com 100 mg/kg do aditivo (P < 0,005). ^{AB}: Médias seguidas por letras maiúsculas diferem pelo teste F a 10%. ^{AB}: Comparações entre frangos suplementados com 0,0; e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, provenientes de matrizes não suplementadas e suplementadas com o mesmo aditivo (P < 0,048 e P < 0,002, respectivamente).

DISCUSSÃO

A suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes demonstrou ter papel significativo na transferência de nutrientes essenciais para os ovos (Fatemi et al., 2020; Barnkob et al., 2020; Yusuf et al., 2023). Após a absorção e metabolismo desses nutrientes no organismo das matrizes, o 1,25(OH)₂D₃-G pode ter modulado a absorção e mobilização de cálcio, facilitando sua deposição na gema e no líquido amniótico dos ovos. Esses componentes são essenciais para a mineralização óssea embrionária e, consequentemente, para o desenvolvimento adequado do esqueleto do embrião (Kanani et al., 2022; Setiyaningsih et al., 2023).

Além disso, a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G pode ter influenciado outros processos fisiológicos, promovendo a transferência aprimorada de proteínas e lipídios, nutrientes cruciais

para o crescimento do embrião e a formação muscular (Abboud et al., 2017; Rybchyn et al., 2020; Li et al., 2021). Esses efeitos combinados, resultantes da influência do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ na mobilização de cálcio e na transferência de outros nutrientes, provavelmente contribuíram para o aprimoramento do desenvolvimento embrionário, refletido no maior peso dos pintinhos provenientes de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ (Atencio et al., 2005; El-Fiky et al., 2022). Estudos anteriores também relataram benefícios da vitamina D_3 na qualidade dos ovos e no desenvolvimento embrionário, especialmente em termos de deposição de cálcio e otimização da absorção de nutrientes essenciais pelo embrião (Fatemi et al., 2020; Aye Cho et al., 2020; Khan et al., 2023).

A suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de frangos de corte durante a fase de crescimento também se mostrou eficaz. A redução do consumo de ração observada nos frangos de corte que receberam 50 mg/kg e a melhoria na conversão alimentar com doses de 50 e 100 mg/kg aos 42 dias de idade sugerem que esses efeitos estavam associados a uma maior eficiência na utilização dos nutrientes, eliminando a necessidade de um maior consumo de ração. Esses resultados são consistentes com o estudo de Souza et al. (2013), que avaliou o efeito de diferentes níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de frangos de corte e observou uma menor conversão alimentar aos 42 dias de idade com a dose de 100 mg/kg. Da mesma forma, o estudo de Castro et al. (2018) encontrou uma melhoria na conversão alimentar quando os frangos de corte foram alimentados com 1 e 2 $\mu\text{g/kg}$ de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aos 42 dias de idade. Esses resultados destacam a importância da vitamina D_3 na melhoria da eficiência alimentar dos frangos de corte, provavelmente devido à sua capacidade de otimizar a utilização dos nutrientes (Vieites et al., 2018; Wu et al., 2022; Khan et al., 2023).

Os resultados da interação entre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ nas dietas de matrizes e de frangos de corte mostraram que, independentemente da origem dos frangos, aqueles suplementados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ apresentaram melhorias na morfologia intestinal aos 42 dias de idade. A redução na profundidade das criptas indicou uma adaptação favorável na estrutura intestinal, levando a uma melhor utilização da ração (Wu et al., 2022; Hui et al., 2022). A maior relação vilosidade:cripta pode estar associada a uma melhoria na renovação celular e na capacidade de absorção, embora sejam necessárias mais evidências para confirmar essa associação (Souza e Vieites, 2014; Shojadoost et al., 2015, 2021). Estudos sugerem que a melhora na morfologia intestinal, observada por meio da maior relação vilosidade:cripta, pode estar relacionada ao aumento da eficiência na digestão e absorção de nutrientes, o que poderia contribuir para uma resposta imune mais equilibrada (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Jaime et al., 2020; Ismailova e White, 2022). Uma mucosa

intestinal saudável é crucial para a defesa contra patógenos e para a manutenção do equilíbrio microbiano (Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020; Wu et al., 2022).

A interação entre a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G nas dietas de matrizes e frangos de corte também demonstrou que, independentemente da origem dos frangos de corte, a suplementação com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G resultou em um aumento na expressão de interleucina 10 aos 42 dias de idade. Essa dosagem provavelmente contribuiu para a manutenção da homeostase intestinal por meio de respostas imunes equilibradas (Kumar et al., 2017; Hsiao et al., 2018; Nunes et al., 2020; Han et al., 2022). Esse mecanismo regulador mostrou-se particularmente eficaz no controle da inflamação intestinal (Han et al., 2018; Koivisto et al., 2020; Chen et al., 2021b; Wu et al., 2022).

Além disso, os efeitos observados permaneceram consistentes independentemente da origem dos frangos de corte, sugerindo que a resposta imunomoduladora foi predominantemente mediada por interações diretas entre o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G e componentes do sistema imunológico, em vez de fatores relacionados à origem dos frangos (Jaime et al., 2020; Ismailova e White, 2022). Esse padrão de resposta apoia a hipótese de que o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G desempenha um papel central na modulação do sistema imunológico, atuando como um mediador eficiente na manutenção da integridade intestinal (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Geng et al., 2018). Estudos anteriores já destacaram a capacidade do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G de influenciar a diferenciação de células imunes, incluindo macrófagos e linfócitos T reguladores, contribuindo para a redução dos processos inflamatórios (Koivisto et al., 2020; Dimitrov et al., 2021).

A comparação dos resultados da interação revelou que a maior área de absorção intestinal e a maior relação vilosidade: cripta em frangos de corte provenientes de matrizes não suplementadas estavam associadas a adaptações fisiológicas que aprimoraram a eficiência intestinal (Hsiao et al., 2018; Aye Cho et al., 2020; Han et al., 2022). Além disso, esses resultados provavelmente refletiram diferenças no ambiente pré-eclosão ou na transferência de nutrientes das matrizes, influenciando o desenvolvimento intestinal dos frangos de corte durante o crescimento (Fatemi et al., 2020; Barnkob et al., 2020; Kanani et al., 2022). Esses achados também podem sugerir que, apesar da ausência de suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G nas matrizes, os frangos de corte possuem a capacidade de adaptar suas estruturas intestinais para otimizar a absorção de nutrientes, potencialmente como uma resposta compensatória (Aye Cho et al., 2020; Wu et al., 2022; Han et al., 2022).

Por outro lado, frangos de corte de matrizes suplementadas, quando alimentados com 100 mg/kg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -G, exibiram níveis mais elevados de interleucina 10 e interleucina 1β

em comparação aos frangos de corte que receberam a mesma concentração vitamínica na dieta, mas eram oriundos de matrizes não suplementadas. Esses resultados indicam que a suplementação das matrizes pode ter induzido um efeito de programação, caracterizado por modificações permanentes nos mecanismos fisiológicos e imunológicos dos frangos de corte (Saini et al., 2013; Nunes et al., 2020; Chen et al., 2021b). Esse efeito foi possivelmente desencadeado por estímulos específicos durante o desenvolvimento embrionário, potencializando as respostas imunes, particularmente no controle da inflamação (Chou et al., 2021).

Os resultados obtidos neste estudo estão alinhados com Zhang et al. (2016), que observaram que a adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ às dietas de frangos de corte modulou a expressão de genes específicos por meio de elementos responsivos ao hormônio da vitamina D (VDREs). Esse achado sustenta a hipótese de que a suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ influencia a regulação gênica, possivelmente ativando vias moleculares associadas à modulação imunológica (Rodriguez-Lecompte et al., 2016; Jaime et al., 2020). O efeito de programação observado neste estudo, induzido pela suplementação das matrizes, pode estar associado à ativação dos VDREs durante o desenvolvimento embrionário, promovendo respostas fisiológicas no desenvolvimento dos frangos de corte (Nunes et al., 2020).

Os resultados também mostraram que frangos de corte oriundos de matrizes suplementadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ apresentaram níveis elevados de creatina quinase e fosfatase alcalina no sangue aos 42 dias de idade. O aumento da fosfatase alcalina pode refletir uma adaptação mais complexa do sistema mineral e esquelético, envolvendo não apenas uma remodelação óssea aprimorada, mas também uma resposta do sistema mineral que preserva o equilíbrio de minerais essenciais, como cálcio e fósforo (Liao et al., 2017; Jacquillet e Unwin, 2019; Lv et al., 2022). Esse processo de adaptação parece estar acompanhado pelo aumento da creatina quinase, que está envolvida no metabolismo energético muscular (Colet et al., 2015; Sakkas et al., 2019; Setiyaningsih et al., 2023).

Nesse contexto, o aumento simultâneo da fosfatase alcalina e da creatina quinase pode indicar uma resposta coordenada entre os processos de remodelação óssea e adaptação muscular (Sakkas et al., 2019; Yavaş et al., 2020; Li et al., 2021). Essa resposta metabólica foi provavelmente desencadeada pela suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3\text{-G}$ administrada às matrizes, que transferiu maiores quantidades de nutrientes aos embriões, otimizando a mineralização óssea e mobilizando recursos energéticos para sustentar a função muscular sem comprometer o equilíbrio de cálcio e fósforo (Bassi et al., 2023).

Além disso, a suplementação ao longo do crescimento dos frangos de corte pode ter intensificado a remodelação óssea e aumentado a demanda energética muscular, como evidenciado pelo aumento da creatina quinase (Abboud et al., 2017; Rybchyn et al., 2020). Assim, o organismo dos frangos de corte parece ter regulado de forma eficiente o metabolismo mineral e energético, garantindo o funcionamento adequado dos sistemas esquelético e muscular (Vieites et al., 2017, 2018; Wu et al., 2022).

Os resultados também mostraram que frangos de corte de matrizes suplementadas com 1,25(OH)₂D₃-G apresentaram menor teor de matéria seca no osso tibial aos 42 dias de idade. Esse menor teor de matéria seca pode ser interpretado como uma resposta à modulação do metabolismo mineral, em que a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes promoveu a ativação dos processos de remodelação óssea sem uma deposição excessiva de minerais nos ossos (Souza e Vieites, 2014; Sakkas et al., 2019; Li et al., 2021). O equilíbrio entre a mineralização óssea e a mobilização de nutrientes pode ter sido ajustado para sustentar a saúde óssea e, ao mesmo tempo, atender a outras demandas metabólicas, como a manutenção da função muscular, evidenciada pelo aumento da creatina quinase (Yavaş et al., 2020; Chen et al., 2021b).

Os resultados relacionados à discondroplasia tibial em frangos de corte aos 42 dias de idade revelaram certa complexidade, destacando que a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas dietas de matrizes e frangos de corte teve impactos distintos na saúde óssea. Quando a suplementação foi fornecida às matrizes, observou-se que frangos de corte provenientes dessas matrizes apresentaram menor escore médio de lesões tibiais e maior ausência de lesões em comparação com frangos de corte de matrizes não suplementadas. Esses resultados sugerem que a suplementação de 1,25(OH)₂D₃-G nas matrizes pode ter exercido um efeito protetor indireto sobre a saúde óssea dos frangos de corte, possivelmente por meio da transferência de nutrientes essenciais para o desenvolvimento ósseo durante a fase inicial da vida (Colet et al., 2015; Świątkiewicz et al., 2017; Cao et al., 2021).

Embora não tenha sido observada diferença significativa nas concentrações de cálcio e fósforo na tíbia dos frangos de corte, o aumento da atividade da fosfatase alcalina indicou que a renovação óssea foi estimulada, o que pode ter contribuído para a redução das lesões tibiais (Colet et al., 2015; Vieites et al., 2017; Yavaş et al., 2020; Asnayanti et al., 2024). No entanto, a ausência de alterações nos índices de mineralização óssea sugere que a suplementação nas matrizes pode ter favorecido o desenvolvimento ósseo dos frangos de corte sem necessariamente alterar os processos de mineralização óssea (Ponso et al., 2012; Kumar et al., 2017; Hsiao et al., 2018; Yang et al., 2020).

Por outro lado, a suplementação de 50 e 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta dos frangos de corte ao longo do crescimento, independentemente da sua origem, resultou em um maior escore de lesões e maior incidência de lesões leves aos 42 dias de idade. Esse resultado pode ter sido causado por um desequilíbrio no processo de mineralização óssea, induzido pela suplementação excessiva de 1,25(OH)₂D₃-G durante o crescimento dos frangos de corte (Chen et al., 2021a; Hui et al., 2022). O metabólito 1,25(OH)₂D₃-G é crucial na regulação da absorção de cálcio e fósforo e na sua deposição nos ossos, mas quando administrado em doses excessivas, pode desencadear um desequilíbrio na mineralização óssea (Alves et al., 2018; Yavaş et al., 2020). Mesmo com níveis normais de cálcio e fósforo no sangue e na tíbia, o excesso de 1,25(OH)₂D₃-G pode ter alterado a estrutura óssea, resultando em ossos mais frágeis e suscetíveis a lesões (Vieites et al., 2016; Anderson, 2017; Alharbi et al., 2025).

CONCLUSÃO

A suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G na dieta das matrizes mostrou-se eficaz para obter frangos de corte mais pesados na eclosão e reduzir a incidência de lesões de discondroplasia tibial aos 42 dias de idade. Enquanto a suplementação de 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G durante a fase de crescimento dos frangos de corte, independentemente de sua origem, resultou em melhor conversão alimentar, além de favorecer a saúde intestinal e a resposta imune. Além disso, a interação entre a suplementação nas matrizes e nos frangos de corte, quando ambos suplementados com 100 mg/kg de 1,25(OH)₂D₃-G, potencializou a resposta imunológica nos frangos aos 42 dias de idade.

REFERÊNCIAS

- Abboud M, Rybchyn MS, Liu J, Ning Y, Gordon-Thomson C, Brennan-Speranza TC, Cole L, Greenfield H, Fraser DR, Mason RS. 2017. The effect of parathyroid hormone on the uptake and retention of 25-hydroxyvitamin D in skeletal muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 173:173–179. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.001
- Alharbi K, Asnayanti A, Hasan A, Vaught WJ, Buehler K, Van der Klis JD, Gonzalez J, Kidd MT, Alrubaye A. 2025. Investigating the effect of 1,25 dihydroxycholecalciferol-glycosides and phytogetic antioxidants against bacterial chondronecrosis induced by aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research.* 34(1):100507. doi:10.1016/j.japr.2024.100507
- Alves O dos S, Calixto LFL, Araujo AHB, Torres-Cordido KAA, Reis TL, Calderano AA. 2018. Decreased levels of vitamin D₃ and supplementation with 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. *Ciência Rural.* 48(8). doi:10.1590/0103-8478cr20170705
- Anderson PH. 2017. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Curr Osteoporos Rep.* 15(5):443–449. doi:10.1007/s11914-017-0394-8

- Asnayanti A, Alharbi K, Do ADT, Al-Mitib L, Bühler K, Van der Klis JD, Gonzalez J, Kidd MT, Alrubaye AAK. 2024. Early 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycosides supplementation: an efficient feeding strategy against bacterial chondronecrosis with osteomyelitis lameness in broilers assessed by using an aerosol transmission model. *Journal of Applied Poultry Research*. 33(3):100440. doi:10.1016/j.japr.2024.100440
- Atencio A, Edwards HM, Pesti G. 2005. Effects of vitamin D₃ dietary supplementation of broiler breeder hens on the performance and bone abnormalities of the progeny. *Poult Sci*. 84(7):1058–1068. doi:10.1093/ps/84.7.1058
- Aye Cho T-Z, Sadiq MB, Srichana P, Anal AK. 2020. Vitamin D₃ enhanced intestinal phosphate cotransporter genes in young and growing broilers. *Poult Sci*. 99(4):2041–2047. doi:10.1016/j.psj.2019.11.038
- Babazadeh D, Razavi SA, Abd El-Ghany WA, F Cotter P. 2022. Vitamin D Deficiency in Farm Animals: A Review. *Farm Animal Health and Nutrition*. 1(1):10–16. doi:10.58803/fahn.v1i1.7
- Bachmann H, Autzen S, Frey U, Wehr U, Rambeck W, McCormack H, Whitehead CC. 2013. The efficacy of a standardised product from dried leaves of *Solanum glaucophyllum* as source of 1,25-dihydroxycholecalciferol for poultry. *Br Poult Sci*. 54(5):642–652. doi:10.1080/00071668.2013.825692
- Barnkob LL, Argyraki A, Jakobsen J. 2020. Naturally enhanced eggs as a source of vitamin D: A review. *Trends Food Sci Technol*. 102:62–70. doi:10.1016/j.tifs.2020.05.018
- Bassi LS, Moreno FA, Martins CCS, Sens RF, Lozano-Poveda CA, Maiorka A. 2023. Effect of 25-hydroxycholecalciferol supplementation with different dietary available phosphorus levels for broilers. *Br Poult Sci*.:1–8. doi:10.1080/00071668.2023.2278474
- Cao S, Li T, Shao Y, Zhang L, Lu L, Zhang R, Hou S, Luo X, Liao X. 2021. Regulation of bone phosphorus retention and bone development possibly by related hormones and local bone-derived regulators in broiler chicks. *J Anim Sci Biotechnol*. 12(1):88. doi:10.1186/s40104-021-00610-1
- Castro FL de S, Baião NC, Ecco R, Louzada MJQ, Melo É de F, Saldanha MM, Triginelli MV, Lara LJC. 2018. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D₃ level on broiler performance and bone quality. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 47(0). doi:10.1590/rbz4720170186
- Chen C, Adhikari R, White DL, Kim WK. 2021. Role of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Osteogenic Differentiation and Mineralization of Chicken Mesenchymal Stem Cells. *Front Physiol*. 12. doi:10.3389/fphys.2021.479596
- Chen Y, Ma H, Du Y, Dong J, Jin C, Tan L, Wei R. 2021. Functions of 1,25-dihydroxy vitamin D₃, vitamin D₃ receptor and interleukin-22 involved in pathogenesis of gout arthritis through altering metabolic pattern and inflammatory responses. *PeerJ*. 9:e12585. doi:10.7717/peerj.12585
- Cheng YH, Goff JP, Sell JL, Dallorso ME, Gil S, Pawlak SE, Horst RL. 2004. Utilizing *Solanum glaucophyllum* Alone or with Phytase to Improve Phosphorus Utilization in Broilers. *Poult Sci*. 83(3):406–413. doi:10.1093/ps/83.3.406
- Chou P-C, Lin P-C, Wu S-W, Wang C-K, Chung T-K, Walzem RL, Lai L-S, Chen S-E. 2021. Differential Modulation of 25-hydroxycholecalciferol on Innate Immunity of Broiler Breeder Hens. *Animals*. 11(6):1742. doi:10.3390/ani11061742
- Colet S, Garcia R, Almeida Paz I, Caldara F, Borille R, Royer A, Nääs I, Sgavioli S. 2015. Bone characteristics of broilers supplemented with vitamin D. *Rev Bras Cienc Avic*. 17(3):325–332. doi:10.1590/1516-635x1703325-332
- Crenshaw TD, Peo ER, Lewis AJ, Moser BD. 1981. Bone Strength as a Trait for Assessing Mineralization in Swine: a Critical Review of Techniques Involved. *J Anim Sci*. 53(3):827–835. doi:10.2527/jas1981.533827x

- Dimitrov V, Barbier C, Ismailova A, Wang Y, Dmowski K, Salehi-Tabar R, Memari B, Groulx-Boivin E, White JH. 2021. Vitamin D-regulated Gene Expression Profiles: Species-specificity and Cell-specific Effects on Metabolism and Immunity. *Endocrinology*. 162(2). doi:10.1210/endocr/bqaa218
- Edwards HM. 1989. The Effect of Dietary Cholecalciferol, 25-Hydroxycholecalciferol and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on the Development of Tibial Dyschondroplasia in Broiler Chickens in the Absence and Presence of Disulfiram. *J Nutr*. 119(4):647–652. doi:10.1093/jn/119.4.647
- El-fiky, A. A., Abdou, F. H., Enab, A. A., Gad, Yasmin S., Selim, Dina A. 2022. Influence of in ovo injection with vitamin d3 on some physiological parameters and bone development of norfa chicks. *Menoufia Journal of Animal Poultry and Fish Production*. 6(4):73–87. doi:10.21608/mjapfp.2022.236043
- Fatemi SA, Elliott KEC, Bello A, Durojaye OA, Zhang H-J, Peebles ED. 2020. The effects of in ovo injected vitamin D3 sources on the eggshell temperature and early posthatch performance of Ross 708 broilers. *Poult Sci*. 99(3):1357–1362. doi:10.1016/j.psj.2019.10.055
- Geng Y, Ma Q, Wang Z, Guo Y. 2018. Dietary vitamin D3 supplementation protects laying hens against lipopolysaccharide-induced immunological stress. *Nutr Metab (Lond)*. 15(1):58. doi:10.1186/s12986-018-0293-8
- Han J, Wu L, Lv X, Liu M, Zhang Y, He L, Hao J, Xi L, Qu H, Shi C, et al. 2022. Intestinal segment and vitamin D3 concentration affect gene expression levels of calcium and phosphorus transporters in broiler chickens. *J Anim Sci Technol*. doi:10.5187/jast.2022.e78
- Han JC, Zhang JL, Zhang N, Yang X, Qu HX, Guo Y, Shi CX, Yan YF. 2018. Age, phosphorus, and 25-hydroxycholecalciferol regulate mRNA expression of vitamin D receptor and sodium-phosphate cotransporter in the small intestine of broiler chickens. *Poult Sci*. 97(4):1199–1208. doi:10.3382/ps/pex407
- Haussler MR, Livingston S, Sabir ZL, Haussler CA, Jurutka PW. 2021. Vitamin D Receptor Mediates a Myriad of Biological Actions Dependent on Its 1,25-Dihydroxyvitamin D Ligand: Distinct Regulatory Themes Revealed by Induction of Klotho and Fibroblast Growth Factor-23. *JBMR Plus*. 5(1). doi:10.1002/jbm4.10432
- Hsiao FS-H, Cheng Y-H, Han J-C, Chang M-H, Yu Y-H. 2018. Effect of different vitamin D3 metabolites on intestinal calcium homeostasis-related gene expression in broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 47(0). doi:10.1590/rbz4720170015
- Hui Q, Zhao X, O K, Yang C. 2022. Effects of l-Tryptophan and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Compact Bones of Broilers and Layers. *J Agric Food Chem*. 70(34):10476–10489. doi:10.1021/acs.jafc.2c03451
- Ismailova A, White JH. 2022. Vitamin D, infections and immunity. *Rev Endocr Metab Disord*. 23(2):265–277. doi:10.1007/s11154-021-09679-5
- Jacquot G, Unwin RJ. 2019. Physiological regulation of phosphate by vitamin D, parathyroid hormone (PTH) and phosphate (Pi). *Pflugers Arch*. 471(1):83–98. doi:10.1007/s00424-018-2231-z
- Jaime J, Vargas-Bermúdez DS, Yitbarek A, Reyes J, Rodríguez-Lecompte JC. 2020. Differential immunomodulatory effect of vitamin D (1,25(OH)2D3) on the innate immune response in different types of cells infected in vitro with infectious bursal disease virus. *Poult Sci*. 99(9):4265–4277. doi:10.1016/j.psj.2020.06.006
- Kanani R, Kianfar R, Janmohammadi H, Kyun Kim W, Olyaei M. 2022. Influence of vitamin D3 and lactic acid on performance, egg quality, and hatchability in broiler breeder hens. *Animal Production Research*. 11(3):67–81. doi:10.22124/ar.2022.21551.1683

- Khan RU, Naz S, Ullah H, Khan NA, Laudadio V, Ragni M, Piemontese L, Tufarelli V. 2023. Dietary vitamin D: growth, physiological and health consequences in broiler production. *Anim Biotechnol.* 34(4):1635–1641. doi:10.1080/10495398.2021.2013861
- Kisielinski K, Willis S, Prescher A, Klosterhalfen B, Schumpelick V. 2002. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clin Exp Med.*
- Koivisto O, Hanel A, Carlberg C. 2020. Key Vitamin D Target Genes with Functions in the Immune System. *Nutrients.* 12(4):1140. doi:10.3390/nu12041140
- Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. 2013. The Vitamin D Receptor and T Cell Function. *Front Immunol.* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00148
- Kumar R, Brar RS, Banga HS. 2017. Hypervitaminosis D3 in broiler chicks: histopathological, immunomodulatory and immunohistochemical approach. *Iran J Vet Res.* 18(3):170–176.
- Li H-M, Liu Y, Zhang R-J, Ding J-Y, Shen C-L. 2021. Vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: a meta-analysis. *Rheumatology.* 60(2):538–548. doi:10.1093/rheumatology/keaa644
- Liao XD, Suo HQ, Lu L, Hu YX, Zhang LY, Luo XG. 2017. Effects of sodium, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone fragment on inorganic P absorption and Type IIb sodium-phosphate cotransporter expression in ligated duodenal loops of broilers. *Poult Sci.* 96(7):2344–2350. doi:10.3382/ps/pex033
- Liu MY, Wu LH, Lv XL, He L, Hao JF, Ma BB, Xi L, Qiao YY, Tang F, Han JC. 2023. 25-hydroxycholecalciferol affects growth performance, bone calcium content and intestinal calcium transporter gene expression in broiler chickens. *J Anim Feed Sci.* 32(2):138–145. doi:10.22358/jafs/157475/2023
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Luna LG. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In: Pathology. Vol. 3. New York.
- Lv X, Hao J, Wu L, Liu M, He L, Qiao Y, Cui Y, Wang G, Zhang C, Qu H, Han J. 2022. Age quadratically affects intestinal calcium and phosphorus transporter gene expression in broiler chickens. *Anim Biosci.* 35(12):1921–1928. doi:10.5713/ab.22.0058
- Martens P-J, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. 2020. Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients.* 12(5):1248. doi:10.3390/nu12051248
- Mathis G, Boland R, Bachmann H, Toggenburger A, Rambeck W. 2016. Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D3 of herbal origin in broiler chicken. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 158(12):819–826. doi:10.17236/sat00097
- Nunes RA, Duarte M de S, Campos PHRF, de Oliveira LL, e Silva FF, Kreuz BS, Mirabile CG, Borges SO, Calderano AA. 2020. Active vitamin D3-glycoside preserves weight gain and modulates the inflammatory response in broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Anim Feed Sci Technol.* 270:114704. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114704
- Nunes RV, Broch J, Wachholz L, de Souza C, Damasceno JL, Oxford JH, Bloxham DJ, Billard L, Pesti GM. 2018. Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. *Poult Sci.* 97(10):3746–3754. doi:10.3382/ps/pey217
- Pande V V., Chousalkar KC, Bhanugopan MS, Quinn JC. 2015. Super pharmacological levels of calcitriol (1,25-(OH)₂ D3) inhibits mineral deposition and decreases cell proliferation in a strain dependent manner in chicken mesenchymal stem cells undergoing osteogenic differentiation in vitro. *Poult Sci.* 94(11):2784–2796. doi:10.3382/ps/pev284

- Ponso R, Faria DE de, Albuquerque R de, Paz IC de LA, Artoni SMB, Santos AL dos, Saviani G, Araújo CMM de. 2012. Avaliação do desenvolvimento da discondroplasia tibial em frangos de corte submetidos à dieta com 25 hidroxicolecalciferol. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 49(2):153. doi:10.11606/issn.2318-3659.v49i2p153-161
- Rodriguez-Lecompte JC, Yitbarek A, Cuperus T, Echeverry H, van Dijk A. 2016. The immunomodulatory effect of vitamin D in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels. *Poult Sci.* 95(11):2547–2556. doi:10.3382/ps/pew186
- Rostagno HS, Albino LFT, Calderano AA, Hanas MI, Sakomura NK, Perazzo F, Rocha GC, Saraiva A, Abreu MLT, Genova JL, Tavernari FC. 2024. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Suprema. Visconde do Rio Branco.
- Rybhyn MS, Abboud M, Puglisi DA, Gordon-Thomson C, Brennan-Speranza TC, Mason RS, Fraser DR. 2020. Skeletal Muscle and the Maintenance of Vitamin D Status. *Nutrients.* 12(11):3270. doi:10.3390/nu12113270
- Saini RK, Kaneko I, Jurutka PW, Forster R, Hsieh A, Hsieh J-C, Haussler MR, Whitfield GK. 2013. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Expression in Bone Cells: Evidence for Primary and Secondary Mechanisms Modulated by Leptin and Interleukin-6. *Calcif Tissue Int.* 92(4):339–353. doi:10.1007/s00223-012-9683-5
- Sakkas P, Smith S, Hill TR, Kyriazakis I. 2019. A reassessment of the vitamin D requirements of modern broiler genotypes. *Poult Sci.* 98(1):330–340. doi:10.3382/ps/pey350
- Sakomura NK, Rostagno SH. 2016. Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos. FUNEP, editor. Jaboticabal.
- SAS Institute. 2014. SAS University Edition: Installation Guide for Windows.
- Setiyaningsih N, Jayanegara A, Wardani WW. 2023. Effects of a Vitamins D and C Supplement on Performance, Hatchability and Blood Profiles of Broiler Breeders. *J Worlds Poult Res.* doi:10.36380/jwpr.2023.7
- Shojadoost B, Behboudi S, Villanueva AI, Brisbin JT, Ashkar AA, Sharif S. 2015. Vitamin D3 modulates the function of chicken macrophages. *Res Vet Sci.* 100:45–51. doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.009
- Shojadoost B, Yitbarek A, Alizadeh M, Kulkarni RR, Astill J, Boodhoo N, Sharif S. 2021. Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. *Poult Sci.* 100(4):100930. doi:10.1016/j.psj.2020.12.027
- Silva DJ, Queiroz AC. 2006. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa.
- Souza CS, Vieites FM, Nunes RV, Brusamarello E, Reis TL, Lima CAR de, Vargas Junior JG de. 2020. Suplemento de 1,25-dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte fêmeas. *Research, Society and Development.* 9(7):e119973975. doi:10.33448/rsd-v9i7.3975
- Souza CS, Vieites FM, Vasconcellos CHF, Calderano AA, Nunes RV, Ferreira CM, Pereira TVS, Moraes GHK. 2013. Suplemento de 1,25 dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 65(2):519–525. doi:10.1590/S0102-09352013000200031
- Souza CS, Vieites FM. 2014. Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. *Archivos de Zootecnia.* 63(241):11–24. doi:10.21071/az.v63i241.588
- Świątkiewicz S, Arczewska-Włosek A, Bederska-Lojewska D, Józefiak D. 2017. Efficacy of dietary vitamin D and its metabolites in poultry - review and implications of the recent studies. *Worlds Poult Sci J.* 73(1):57–68. doi:10.1017/S0043933916001057

- Trautenmüller H, Genova JL, Santos LB de A dos, Leal IF, Santos G de B, Rupolo PE, Nunes RV, Oliveira ER de, Carvalho PL de O. 2022. Partial cholecalciferol replacement with 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside in diets for piglets. *Anim Prod Sci.* 62(16):1590–1599. doi:10.1071/AN21150
- Vazquez JR, Gómez GV., López CC, Cortés AC, Díaz AC, Fernández SRT, Rosales EM, Avila AG. 2018. Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 102(1). doi:10.1111/jpn.12715
- Vieites FM, Brusamarello E, Corrêa G da SS, Souza CS, De Oliveira CFS, De Moraes GHK, Caramori Júnior JG. 2018. 1,25-dihidroxicolecalciferol de origem herbal (*Solanum glaucophyllum*) mantém o desempenho e a qualidade óssea de frangos de corte fêmeas durante restrição de cálcio e fósforo. *Archivos de Zootecnia.* 67(259):414–419. doi:10.21071/az.v67i259.3799
- Vieites FM, Drosghic LCAB, Souza CS, Lima CAR, Moraes GHK, Nunes RV, Vasconcellos CHF, Vargas Júnior JG. 2017. 1,25-dihidroxitamina-D3 sobre as características ósseas de frangos de corte fêmeas. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 69(5):1285–1293. doi:10.1590/1678-4162-9371
- Vieites FM, Drosghic LCAB, Souza CS, Vargas Júnior JG, Nunes RV, Moraes GHK de, Corrêa GSS, Caramori Júnior JG. 2016. Características ósseas de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semin Cienc Agrar.* 37(1):381. doi:10.5433/1679-0359.2016v37n1p381
- Vieites FM, Nalon RP, Santos AL, Castelo Branco PA, Souza CS, Nunes RV, Calderano AA, Arruda NVM de. 2014. Desempenho, rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. *Semin Cienc Agrar.* 35(3):1617. doi:10.5433/1679-0359.2014v35n3p1617
- Wu L, Wang X, Lv X, He L, Qu H, Shi C, Zhang L, Zhang J, Wang Z, Han J. 2022. 1,25-Dihydroxycholecalciferol Improved the Growth Performance and Upregulated the Calcium Transporter Gene Expression Levels in the Small Intestine of Broiler Chickens. *J Poult Sci.* 59(2):0210019. doi:10.2141/jpsa.0210019
- Yang X, Zhang N, Wang X, Qu H, Zhang J, Yan Y, Cheng Y, Han J. 2020. Optimal Dietary Levels of 1-Hydroxycholecalciferol in Broiler Chickens from 1 to 42 Days of Age. *J Poult Sci.* 57(2):124–130. doi:10.2141/jpsa.0190013
- Yavaş İ, Çenesiz AA, Ceylan N. 2020. Effects of Herbal Vitamin D3 and Phytase Supplementation to Broiler Feed on Performance, Bone Development and Serum Parameters of Broilers. *Tarım Bilimleri Dergisi.* doi:10.15832/ankutbd.479182
- Yu Y, Li Q, Zhang H, Wu Y, Zhang R, Yue M, Yang C, Cao G. 2022. *Clostridium butyricum* alone or combined with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 improved early-stage broiler health by modulating intestinal flora. *J Appl Microbiol.* 132(1):155–166. doi:10.1111/jam.15180
- Yusuf GM, Sumiati S, Mutia R, Wardani WW, Akbar I, Putri NDS. 2023. Performance, Egg Quality, Bone Health, and Immunity Assessments of Lohmann Laying Hens Supplemented with Vitamin D3 in the Diet. *Tropical Animal Science Journal.* 46(4):461–470. doi:10.5398/tasj.2023.46.4.461
- Zhang L, Lu L, Li S, Zhang G, Ouyang L, Robinson K, Tang Y, Zhu Q, Li D, Hu Y, Liu Y. 2016. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Induces Avian β -Defensin Gene Expression in Chickens. *PLoS One.* 11(5):e0154546. doi:10.1371/journal.pone.0154546