



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

APOLÔNIO GOMES RIBEIRO

**SUPERDOSAGEM DE FITASE EM DIETAS DE CODORNAS JAPONESAS SOB
ESTRESSE TÉRMICO: IMPLICAÇÕES NOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO
CALBINDIN-D28K E TRPV6**

AREIA

2025

APOLÔNIO GOMES RIBEIRO

**SUPERDOSAGEM DE FITASE EM DIETAS DE CODORNAS JAPONESAS SOB
ESTRESSE TÉRMICO: IMPLICAÇÕES NOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO
CALBINDIN-D28K E TRPV6**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia

Orientador: Prof. (a) Dr. (a) Ricardo Romão Guerra (CCA/UFPB)

Coorientador: Prof. Dr. Edilson Paes Saraiva (CCA/UFPB)

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa (CCA/UFPB)

AREIA

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R484s Ribeiro, Apolônio Gomes.

Superdosagem de fitase em dietas de codornas japonesas sob estresse térmico: implicações nos transportadores de cálcio calbindin-D28K e TRPV6 / Apolônio Gomes Ribeiro. - Areia:UFPB/CCA, 2025. 187 f.

Orientação: Ricardo Romão Guerra.

Coorientação: Edilson Paes Saraiva, Fernando Guilherme Perazzo Costa.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Calbindina-D28K. 3. Transportadores de cálcio. 4. Estresse térmico. 5. Suplementação com fitase. 6. TRPV6. I. Guerra, Ricardo Romão. II. Saraiva, Edilson Paes. III. Costa, Fernando Guilherme Perazzo. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636(043.2)

APOLÔNIO GOMES RIBEIRO

SUPERDOSAGEM DE FITASE EM DIETAS DE CODORNAS JAPONESAS SOB
ESTRESSE TÉRMICO: IMPLICAÇÕES NOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO
CALBINDIN-D28K E TRPV6

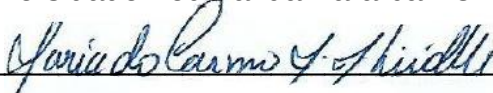
Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito parcial
à obtenção do título de Doutor em
Zootecnia.

Aprovado em: 27/02/2025.

BANCA EXAMINADORA



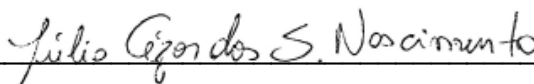
Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Presidente
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Prof. (a) Dr. (a) Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke
Examinadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof. (a) Dr. (a) Lilian Francisco Arantes de Souza
Examinadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof. Dr. Júlio César dos Santos Nascimento
Examinador
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof. (a) Dr. (a) Danila Barreiro Campos
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

SÚMULA CURRICULAR DO AUTOR



Apolônio Gomes Ribeiro ingressou no curso de Bacharelado em Zootecnia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – Campus Crateús, em 2013. Durante a graduação, estagiou no Sindicato dos Trabalhadores Rurais Agricultores e Agricultoras Familiares (STTR) de Crateús, no período de maio a agosto de 2018, com carga horária de 30 horas semanais, atuando nas áreas de avicultura, nutrição de animais não ruminantes, forragicultura e pastagens, técnicas de conservação de forragens e elaboração de projetos agropecuários. Defendeu o trabalho de conclusão de curso intitulado *“Avaliação da influência da idade do abate no rendimento e na qualidade da carne de frangos da raça tricolor”*, sob a orientação da Professora Dra. Luciana Cristina Nogueira de Moraes Bezerra, recebendo o título de Zootecnista em 29 de setembro de 2018. Em agosto de 2019, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – PPGZ/UFRPE, na área de concentração em Produção e Nutrição de Animais Não Ruminantes, com área específica em Avicultura, sob a orientação do Professor Dr. Carlos Bôa-Viagem Rabello. Em 28 de maio de 2021, foi submetido e aprovado no exame de defesa de dissertação intitulada *“Aditivo simbiótico em substituição à bacitracina de zinco em dietas para aves poedeiras na fase de recria”*. Em agosto de 2021, ingressou no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba (PPGZ/UFPB - UFC), Campus II – Areia-PB, na área de concentração em Produção e Nutrição de Animais Não Ruminantes, com ênfase nas áreas específicas de Avicultura e Anatomia-Histologia, sob a orientação do Professor Dr. Ricardo Romão Guerra e coorientação dos Professores Dr. Edilson Paes Saraiva e Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa. Em dezembro de 2024, foi submetido e aprovado no exame de qualificação de Doutorado, com defesa marcada para o dia 20 de dezembro de 2024.

Aos meus avós (*in memoriam*), **Raimundo Gomes da Silva,**
Maria José Castro Silva, Ediva Gomes Ribeiro, Antônio
Gomes da Silva pelos ensinamentos sofisticados cheios de
simplicidade.

À minha mãe **Maria Senhora Gomes Ribeiro**, por todo amor e fé.

Ao meu pai **Adalberto Gomes Ribeiro**, por todos os conselhos e apoio.

As minhas tias: Antônia, Marta, Anizia, Antônia Ribeiro, Mazé, DeJesus.

A minha tia **Maria Eliete Gomes de Castro**, (*in memoriam*) por acreditar em mim
desde sempre.

A minha Namorada, **Dayane Albuquerque da Silva**, por toda companhia e alegria.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, saúde e luz no caminho.

Aos meus pais, Adalberto Gomes Ribeiro e Maria Senhora Gomes Ribeiro, por todo amor, carinho, confiança e apoio durante essa jornada, vocês são meu alicerce. Também aos meus irmãos: Alberto Wagner Gomes Ribeiro, Albery Gomes Ribeiro, Adalmir Gomes Ribeiro, Adairton Gomes Ribeiro, Maria Isabel Gomes Ribeiro e Maria Isabely Gomes Ribeiro pelas boas energias e à minha família pela positividade.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Romão Guerra, por todo o aprendizado, confiança, atenção, amizade, empatia, paciência e brilhante orientação durante essa jornada, por todo o conhecimento repassado, disposição e incentivo a continuar seguindo em frente.

A todos os professores da minha vida, desde as tias do jardim de infância até os professores da pós-graduação do mestrado e doutorado, responsáveis pela minha formação, aprendizado e educação.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo recurso financeiro recebido durante a realização do curso.

Aos meus colegas e amigos da Pós-Graduação em Zootecnia, do Campus II (Areia): Raiane dos Santos Silva, Luiz Arthur dos Anjos Lima, Amana Fernandes Maia, Adiel Vieira de Lima, Valeria Marinho Leite Falcão, Delfino, Halyson, Marcos Rafael de Sousa Rodrigues; e o técnico: Edijanio Galdino da Silva que fizeram parte da nossa pesquisa, ajudando na execução do experimento e nas análises laboratoriais.

Aos Laboratório de Histologia, Biologia molecular do Centro de Ciências Agrárias da UFPB. À Professora Danila Barreiro Campos e a técnica Clara Virgínia Batista de Vasconcelos Alves, pelos ensinamentos e paciência durante minha análises no laboratório de Biologia Molecular.

Aos colegas de Recife (UFRPE), Daniela Pinheiro de Oliveira, Webert Aurino da Silva, Helia Sharlane de Holanda Oliveira, Ana Carolina Ferreira dos Santos, Gabriel Miranda Macambira, Rogério Ventura da Silva Junior, Waleska

Rocha Leite de Medeiros Ventura, Heraldo Bezerra de Oliveira, Camila Guedes Valadares, Elayne de Souza Rocha Soares, amizades que levarei por toda a vida.

Aos professores da UFRPE: Carlos Bôa-Viagem Rabello, Júlio César dos Santos Nascimento, Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke, Wilson Moreira Dutra Junior, Francisco Fernando Ramos de Carvalho, Lilian Francisco Arantes de Souza, pelo apoio nessa jornada de Pós-Graduação.

A todos que dedicaram palavras amigas, de força, positividade e conforto no decorrer dessa longa jornada.

Muito obrigado!

SUPERDOSAGEM DE FITASE EM DIETAS DE CODORNAS JAPONESAS SOB ESTRESSE TÉRMICO: IMPLICAÇÕES NOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6

RESUMO

A avicultura em regiões de clima quente enfrenta desafios significativos devido ao estresse térmico, que compromete o metabolismo mineral e a qualidade da casca dos ovos, especialmente em poedeiras comerciais. Além disso, fatores antinutricionais, como o fitato, presente nos ingredientes das dietas, reduzem a biodisponibilidade de minerais essenciais, como cálcio e fósforo, impactando negativamente o desempenho das aves. A suplementação com fitase surge como uma estratégia eficaz para liberar esses minerais, uma vez que a enzima quebra a molécula de fitato, tornando os nutrientes disponíveis para a absorção pelas aves. Embora existam estudos com galinhas poedeiras e frangos de corte, que demonstram os benefícios da fitase, há poucos estudos utilizando essa enzima em codornas, especialmente em condições de estresse térmico e com superdosagem, o que torna esse campo de pesquisa ainda pouco explorado. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da superdosagem de fitase no desempenho produtivo, qualidade óssea, bioquímica sérica e na expressão gênica dos transportadores de cálcio Calbindin-D28K e TRPV6 em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) sob diferentes temperaturas. O experimento foi conduzido com 720 codornas, em delineamento inteiramente casualizado e em arranjo fatorial 5×3 , com cinco níveis de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU/kg) e três temperaturas (24°C, 30°C e 36°C), totalizando 15 tratamentos, com seis repetições de oito aves cada. Os resultados mostraram que a suplementação com fitase melhorou a espessura da casca dos ovos e a absorção de cálcio, atenuando os efeitos do estresse térmico. A análise óssea indicou que a densidade mineral e a resistência das tíbias foram favorecidas pela enzima, sugerindo um impacto positivo na integridade esquelética. A expressão de Calbindin-D28K no útero foi maior a 30°C, e a expressão renal foi influenciada pela interação entre temperatura e níveis de fitase. A 36°C, as aves apresentaram pior desempenho e alterações bioquímicas típicas do estresse térmico. Com base nos resultados, a suplementação de fitase, especialmente a 1500 FTU/kg, foi eficaz para mitigar os efeitos do estresse térmico, promovendo melhor absorção de cálcio, qualidade da casca e saúde óssea em codornas poedeiras. O estudo também destacou a importância da regulação gênica dos transportadores de cálcio em resposta ao estresse térmico. Em um cenário de mudanças climáticas, a suplementação otimizada de fitase pode ser uma ferramenta promissora para melhorar o desempenho das aves em condições adversas. Estudos futuros são necessários para aprofundar o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação da absorção de minerais e para avaliar a viabilidade da suplementação com fitase em diferentes fases produtivas e linhagens de codornas.

Palavras-Chave: calbindina-D28K; transportadores de cálcio; estresse térmico; suplementação com fitase; TRPV6.

SUPERDOSING OF PHYTASE IN JAPANESE QUAIL DIETS UNDER HEAT STRESS: IMPLICATIONS FOR CALCIUM TRANSPORTERS CALBINDIN-D28K AND TRPV6

ABSTRACT

Poultry farming in hot climate regions faces significant challenges due to thermal stress, which compromises mineral metabolism and egg shell quality, especially in commercial laying hens. In addition, antinutritional factors, such as phytate, present in the ingredients of diets, reduce the bioavailability of essential minerals like calcium and phosphorus, negatively impacting the performance of the birds. Supplementation with phytase emerges as an effective strategy to release these minerals, as the enzyme breaks down the phytate molecule, making the nutrients available for absorption by the birds. Although there are studies with laying hens and broilers that demonstrate the benefits of phytase, there are few studies using this enzyme in quails, especially under thermal stress conditions and with overdosing, which makes this research field still underexplored. The aim of this study was to evaluate the effects of phytase overdosing on productive performance, bone quality, serum biochemistry, and the gene expression of calcium transporters Calbindin-D28K and TRPV6 in Japanese quails (*Coturnix japonica*) under different temperatures. The experiment was conducted with 720 quails, using a completely randomized design and a 5 × 3 factorial arrangement, with five levels of phytase (0, 500, 1000, 1500, and 3000 FTU/kg) and three temperatures (24°C, 30°C, and 36°C), totaling 15 treatments, with six repetitions of eight birds each. The results showed that supplementation with phytase improved egg shell thickness and calcium absorption, mitigating the effects of thermal stress. Bone analysis indicated that the mineral density and strength of the tibias were favored by the enzyme, suggesting a positive impact on skeletal integrity. Calbindin-D28K expression in the uterus was higher at 30°C, and renal expression was influenced by the interaction between temperature and phytase levels. At 36°C, the birds exhibited poorer performance and biochemical alterations typical of thermal stress. Based on the results, phytase supplementation, especially at 1500 FTU/kg, was effective in mitigating the effects of thermal stress, promoting better calcium absorption, egg shell quality, and bone health in laying quails. The study also highlighted the importance of gene regulation of calcium transporters in response to thermal stress. In a scenario of climate change, optimized phytase supplementation could be a promising tool to improve bird performance under adverse conditions. Future studies are needed to further understand the molecular mechanisms involved in the modulation of mineral absorption and to assess the feasibility of phytase supplementation in different production phases and quail strains.

Keywords: calbindin-D28K; calcium transporters; heat stress; phytase supplementation; TRPV6.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – Estresse por calor em codornas japonesas (*Coturnix japonica*): benefícios da suplementação de fitase

Figura 1 – <i>Myo-inositol</i> (a) e myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakis dihidrogênico fospódio (InsP6) (b).....	26
Figura 2 – Hidrólise da molécula de fitato através da ação da enzima fitase.....	28
Figura 3 – Classificação das fitases.....	29
Figura 4 – Desenho esquemático do transporte transepitelial de cálcio.....	41
Figura 5 – Canal seletivo de cálcio TRPV6 e Calbindin-D28K.....	42

CAPÍTULO II – Superdosagem de fitase modula os parâmetros ósseos e a concentração do transportador epitelial de cálcio calbindin-d28k em codornas (*Coturnix japonica*) sob estresse térmico

Figura 6 – Imagem tomográfica em corte transversal da tíbia de codorna japonesa.....	77
Figura 7 – Fotomicrografias de órgãos de codornas japonesas com positividade ao anticorpo, transportador epitelial de cálcio, CalbindinD28K.....	85
Figura 8 – Fotomicrografias de jejuno de codornas japonesas com positividade ao anticorpo, transportador epitelial de cálcio, CalbindinD28K.....	85
Figura 9 – Fotomicrografias de úteros de codornas japonesas com positividade ao anticorpo, transportador epitelial de cálcio, CalbindinD28K.....	87

CAPÍTULO III – Expressão gênica dos transportadores de cálcio calbindin-d28k e trpv6 em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a superdosagem de fitase e sob diferentes temperaturas

Figura 10 –Expressão do gene Calbindin-D28K nos rins de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.....	119
Figura 11 –Expressão do gene Calbindin-D28K no útero de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.....	119

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – Estresse por calor em codornas japonesas (*coturnix japonica*): benefícios da suplementação de fitase

Tabela 1 - Teor de fátato nos alimentos (com base na matéria seca)	26
Tabela 2 - Recomendações de cálcio disponível (Ca) e fósforo (P) para codornas japonesas.....	37

CAPÍTULO II – Superdosagem de fitase modula os parâmetros ósseos e a concentração do transportador epitelial de cálcio calbindin-d28k em codornas (*Coturnix japonica*) sob estresse térmico

Tabela 3 - Dietas experimentais (Tratamentos T1–T5), contendo cinco níveis de suplementação de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU) e redução nas concentrações de fósforo e cálcio, considerando a matriz de 500 FTU da enzima, para codornas japonesas na fase de postura.....	73
Tabela 4 - Valores médios de radiodensidade em diferentes regiões da tíbia de codornas japonesas alimentadas com superdosagem de fitase em diferentes ambientes térmicos.....	81
Tabela 5 - Parâmetros ósseos das tíbias de codornas japonesas alimentadas com superdosagem de fitase em diferentes ambientes térmicos.....	83
Tabela 6 - Equações de regressão dos parâmetros ósseos de tíbias em codornas japonesas alimentadas com superdosagem de fitase em diferentes ambientes térmicos.....	84
Tabela 7 - Positividade para o anticorpo Calbindin-D28K, um transportador de cálcio, no duodeno, jejuno e útero de codornas japonesas submetidas a diferentes temperaturas.....	84
Tabela 8 - Valores médios de consumo de ração (CR), produção total de ovos (PTO) e espessura da casca do ovo (EC) de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.....	86

CAPÍTULO III – Expressão gênica dos transportadores de cálcio calbindin-d28k e trpv6 em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a superdosagem de fitase e sob diferentes temperaturas

Tabela 9 - Dietas experimentais, contendo cinco níveis de Fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU) e redução nos níveis de fósforo e cálcio levando em consideração a matriz de 500 FTU da enzima, para codornas japonesas na fase de postura.....	106
Tabela 10 - Sequência de oligonucleotídeos usados para o PCR quantitativo.....	109
Tabela 11 - Valores médios de consumo de ração (CR), produção total de ovos (PTO), peso dos ovos (PO), massa de ovos (MO) e espessura da casca (EC) de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.....	112

Tabela 12 -Gama Glutamil Transferase (GGT); Fosfatase Alcalina (FA); Fósforo (P); Cálcio (Ca); Creatina Quinase (CK); Ácido Úrico (AU) de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase e submetidas a diferentes temperaturas.....	114
Tabela 13 -Expressão gênica de Calbindin-D28K no duodeno, jejuno, rins e útero de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase e submetidas a diferentes temperaturas.....	116
Tabela 14 -Equações de regressão dos parâmetros de fosfatase alcalina (FA), ácido úrico (AU) e expressão de Calbindin-D28K nos rins de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase, em diferentes ambientes térmicos.....	117
Tabela 15 -Expressão gênica de TRPV6 nos rins de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase e submetidas a diferentes temperaturas.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AFRC	Agriculture and Food Research Council
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CT	Calcitonina
Cu	Cobre
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ET	Estresse Térmico
ETC	Estresse Térmico por Calor
FAL	Fosfatase Alcalina
Fe	Ferro
FTU	Unidade de Fitase
GGT	Gama-Glutamiltransferase
INRA	Institut National de La Recherche Agronomique
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
NRC	National Research Council
pH	Potencial Hidrogênio
P	Fósforo
PTH	Hormônio Paratireoideano
RNA	Ácido Ribonucleico
TRPV6	Canal do Receptor Potencial Transitório do Tipo Vaniloide 6
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VDR	Receptor de Vitamina D
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- * Efeito Linear
- ** Efeito Quadrático

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
2 CAPÍTULO I – ESTRESSE POR CALOR EM CODORNAS JAPONESAS (<i>Coturnix Japonica</i>): BENEFÍCIOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE	18
2.1 RESUMO.....	18
2.2 ABSTRACT	19
2.3 INTRODUÇÃO	20
2.4 CODORNAS JAPONESAS (<i>Coturnix japonica</i>)	21
2.5 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA PRODUÇÃO DE CODORNAS JAPONESAS	22
2.6 FITASE E A HIDROLISE DO FITATO.....	25
2.7 SUPERDOSAGEM DE FITASE	29
2.8 PAPEL DA FITASE NA REDUÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR...31	
2.9 CÁLCIO E FÓSFORO NA DIETA DE CODORNAS POEDEIRAS (<i>Coturnix japonica</i>)	35
2.10 ABSORÇÃO DE CÁLCIO (Ca)	38
2.11 TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE CÁLCIO MEDIADO POR TRPV6 E CALBINDIN-D28K	40
2.12 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	47
3 CAPÍTULO II – SUPERDOSAGEM DE FITASE MODULA OS PARÂMETROS ÓSSEOS E A CONCENTRAÇÃO DO TRANSPORTADOR EPITELIAL DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K EM CODORNAS (<i>COTURNIX COTURNIX JAPONICA</i>) SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	69
3.1 RESUMO.....	69
3.2 ABSTRACT	70
3.3 INTRODUÇÃO	71
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.4.1 Local Experimental e Comitê de Ética.....	72
3.4.2 Animais e Delineamento Experimental.....	72
3.4.3 Alojamento.....	73
3.4.4 Dietas Experimentais	73
3.4.5 Coleta de órgãos	75
3.4.6 Imuno-histoquímica para anti-Calbindin-D28k	75
3.4.7 Análise de resistência óssea e índice de Seedor	76
3.4.8 Densitometria computadorizada.....	76
3.4.9 Minerais na tíbia	78
3.4.10 Consumo de ração, produção total de ovos e espessura da casca dos ovos.....	78
3.4.11 Análises estatísticas	79
3.5 RESULTADOS	80
3.5.1 Parâmetros ósseos das tíbias.....	80
3.5.2 Imuno-histoquímica	84
3.6 DISCUSSÃO	87
3.6.1 Parâmetros ósseos das tíbias.....	88
3.6.2 Imuno-histoquímica	91
3.7 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	94

4 CAPÍTULO III – EXPRESSÃO GÊNICA DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6 EM CODORNAS JAPONESAS (COTURNIX JAPONICA) SUBMETIDAS A SUPERDOSAGEM DE FITASE E SOB DIFERENTES TEMPERATURAS.....	101
4.1 RESUMO.....	101
4.2 ABSTRACT	102
4.3 INTRODUÇÃO	103
4.4 MATERIAL E METODOS	104
4.4.1 Local Experimental e Comitê de Ética.....	104
4.4.2 Animais e Delineamento Experimental.....	104
4.4.3 Alojamento.....	105
4.4.4 Dietas e tratamentos experimentais	105
4.4.5 Avaliação do desempenho produtivo.....	107
4.4.6 Bioquímica sérica do sangue	107
4.4.7 Coleta de órgãos	108
4.4.8 PCR em tempo real (qPCR) para Calbindin-D28k e TRPV6.....	108
4.4.9 Análise estatística	109
4.5 RESULTADOS	110
4.5.1 Desempenho	110
4.5.2 Bioquímica sérica.....	113
4.5.3 Expressão gênica de Calbindin-D28K e TRPV6.....	115
4.6 DISCUSSÃO	120
4.6.1 Parâmetros de desempenho	120
4.6.2 Bioquímica do sangue	121
4.6.3 Expressão gênica de Calbindin-D28K	124
4.6.4 Expressão gênica de TRPV6	126
4.7 CONCLUSÃO.....	126
REFERÊNCIAS.....	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
ANEXOS	134

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em climas tropicais e subtropicais, o estresse térmico por calor tem se tornado um dos principais responsáveis pelos danos produtivos na criação, sendo a temperatura e a umidade relativa do ar as principais causadoras destas perdas (Welker *et al.*, 2008; Vitorasso e Pereira, 2009). Aves quando criadas em ambientes com temperaturas acima da zona de termoneutralidade podem enfrentar distúrbios fisiológicos severos, devido ao aumento do gasto energético para manter a homeostase térmica e à redução da eficiência alimentar, resultante da menor ingestão de ração. Esses fatores, em conjunto, comprometem o ganho de peso corporal e desempenho das aves (Leeson e Summers, 2008; Vaz, 2018).

A menor ingestão de alimento causada pelo estresse térmico pode impedir que as exigências nutricionais das aves sejam atendidas, especialmente em relação aos minerais cálcio e fósforo (Leeson e Summers, 2008; Vaz, 2018). Nesse contexto, estratégias têm sido adotadas para minimizar os efeitos do estresse térmico, como o uso de enzimas exógenas, como a fitase, que libera minerais e vitaminas, contribuindo para o aumento da digestibilidade dos nutrientes da dieta (Carvalho Filho *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2017).

O uso da fitase em dietas animais hidrolisa a molécula de fitato presente no milho, soja e nos demais nutrientes das dietas, liberando o fósforo que está complexado à molécula do ácido fítico, bem como outros minerais (cálcio) e aminoácidos (Campos *et al.*, 2017; Sena *et al.*, 2020). Cálcio e fósforo são minerais ligados diretamente a produção das aves (Bünzen *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010), principalmente as de postura, pois estão presente em vários processos biológicos, como no desenvolvimento e mineralização óssea (Ribeiro *et al.*, 2024) e na formação dos ovos (Dijkslag *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2024). O cálcio por ser o primeiro fator restritivo para a formação da casca dos ovos, é influenciado diretamente pelo aumento de temperatura, implicando em menor ativação dos seus carreadores no epitélio intestinal (Calbindin-D28K e TRPV6), conferindo efeito negativo sobre a produção de ovos, bem como redução de sua qualidade, como espessura da casca (Kim *et al.*, 2020), peso e porcentagem da gema e baixa gravidade específica (Alagawany *et al.*, 2017; Nawab *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da suplementação com fitase em aves submetidas ao estresse térmico, evidenciando que essa enzima pode minimizar os impactos adversos dessa condição climática. A suplementação com fitase tem sido associada ao aumento da produção (Tizziani et al., 2016; Attia e Hasson, 2017) e da qualidade dos ovos (Bello et al., 2020), além de melhorar a retenção de fósforo e a deposição de lipídios hepáticos. Além disso, a enzima pode contribuir para a regulação do metabolismo, auxiliando na manutenção dos níveis de triglicerídeos e no equilíbrio do sistema imunológico, revertendo parcialmente o aumento do índice heterófilo:leucócito e reduzindo a mortalidade (Mohebbifar et al., 2015; Attia e Hasson, 2017) em poedeiras e frangos.

Vale ressaltar que nesses estudos não foram utilizadas superdosagem de fitase, nem codornas. Sendo assim, abrem-se expectativas sobre os benefícios que a superdosagem de fitase possa trazer para a coturnicultura de postura no Brasil e em outros países de clima tropical e equatorial. Neste aspecto, o presente estudo visa verificar os efeitos da superdosagem de fitase nas dietas de codornas de postura em estresse térmico, verificando a expressão RNAm e positividade (proteína) dos transportadores de cálcio calbindin-D28K e TRPV6 nos tecidos de absorção (duodeno e jejuno), reabsorção (rim) e de deposição de cálcio (útero).

2 CAPÍTULO I – ESTRESSE POR CALOR EM CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix Japonica*): BENEFÍCIOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE ¹

2.1 RESUMO

Em regiões de clima tropical e subtropical, o estresse térmico é uma das principais causas de perdas produtivas em codornas poedeiras, agravado pelos efeitos antinutricionais do fitato presente nos ingredientes das dietas, que prejudicam a biodisponibilidade de minerais, especialmente cálcio e fósforo. Essa situação resulta na redução da produção e na qualidade dos ovos de codornas poedeiras comerciais. Diversas estratégias nutricionais são utilizadas para mitigar os efeitos adversos das altas temperaturas e de fatores antinutricionais, como o fitato. Entre essas estratégias, destaca-se o uso de enzimas exógenas, como a fitase, que se apresenta como uma alternativa viável. A fitase degrada as moléculas de fitato, otimizando a absorção de minerais essenciais e melhorando o desempenho produtivo e a qualidade dos ovos em condições desfavoráveis. Especificamente, recomenda-se a utilização de 1500 FTU de fitase, uma vez que, além de reduzir os efeitos do estresse térmico, promove o aumento da espessura da casca dos ovos e melhora a absorção de cálcio. Nesse contexto, esta revisão bibliográfica buscou elaborar um documento que demonstre os efeitos benéficos da enzima fitase na hidrólise da molécula de fitato, na disponibilidade de cálcio para codornas japonesas (*Coturnix japonica*) e suas implicações frente ao estresse térmico causado pelo calor.

Palavras-chave: fatores antinutricionais; absorção de cálcio; enzimas exógenas; codornas poedeiras; fitato.

¹ Artigo Publicado na revista Animals (Anexo A)

2.2 ABSTRACT

In tropical and subtropical climate regions, heat stress is one of the main causes of production losses in laying quails, aggravated by the antinutritional effects of the phytate in diet ingredients, which negatively affect the bioavailability of minerals, especially calcium and phosphorus. This situation results in a reduction in production and the quality of eggs from commercial laying quails. Several nutritional strategies are utilized to reduce the adverse effects of high temperatures and antinutritional factors such as phytate. Among these strategies, the use of exogenous enzymes, such as phytase, stands out as a viable alternative. Phytase breaks down phytate molecules, optimizing the absorption of essential minerals and improving productive performance and egg quality under unfavorable conditions. Specifically, it is recommended to use 1500 FTU of phytase, as it not only reduces the effects of thermal stress but also enhances eggshell thickness and calcium absorption. In this context, this bibliographic review sought to produce a document demonstrating the beneficial effects of the phytase enzyme on the hydrolysis of the phytate molecule, the availability of calcium for Japanese quails (*Coturnix japonica*), and its implications in thermal stress due to heat.

Keywords: antinutritional factors; calcium absorption; exogenous enzymes; laying quails; phytate.

2.3 INTRODUÇÃO

A criação de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) tem despertado o interesse de criadores devido ao rápido crescimento, maturidade sexual precoce, alta produtividade, baixo consumo de ração e longo período produtivo (Santos *et al.*, 2017; Truong *et al.*, 2023). Esse crescente interesse também motiva pesquisadores a realizar estudos voltados para o aprimoramento e fortalecimento da coturnicultura como uma atividade comercial altamente rentável (Moraes *et al.*, 2021).

A exposição das aves a ambientes de estresse térmico por calor (ETC) em áreas tropicais e subtropicais afeta negativamente o desempenho produtivo e causa perdas econômicas substanciais (Niu *et al.*, 2009; Mehaisen *et al.*, 2017; Mehaisen *et al.*, 2019). Está bem documentado que o baixo desempenho das aves expostas ao ETC é, principalmente, devido à redução do consumo de ração como forma de diminuir a produção de calor metabólico (Miller *et al.*, 2002; Mehaisen *et al.*, 2019). Além disso, ocorre um estado de desequilíbrio na fisiologia e imunologia das aves em resposta à exposição ao ETC (Mashaly *et al.*, 2004). Em codornas poedeiras, a exposição a uma temperatura de 34 °C reduziu a produção de ovos e aumentou a conversão alimentar, além de comprometer a qualidade dos ovos (Sahin *et al.*, 2002; Vercese *et al.*, 2012). Além disso, níveis de colesterol na gema e no soro, bem como biomarcadores gerais de estresse, aumentaram em codornas expostas ao ETC (Akdemir *et al.*, 2015).

Portanto, diversas tentativas foram realizadas para minimizar os efeitos negativos do ETC no crescimento e nos aspectos fisiológicos das aves (Patra *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2012), incluindo codornas (Sahin *et al.*, 2002; Sandikci *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2008; Akdemir *et al.*, 2015; Mehaisen *et al.*, 2017; Mehaisen *et al.*, 2019; Akdemir *et al.*, 2019). O uso da enzima fitase destaca-se como uma alternativa, já que sua administração permite a degradação eficaz da molécula de fitato presente nas dietas, resultando na subsequente liberação de minerais e outros nutrientes (Farias *et al.*, 2021), que podem ser utilizados por animais submetidos ao estresse térmico.

A fitase (*myo*-inositol hexafosfato fosfohidrolase) pertence a uma classe de enzimas exógenas cuja função é degradar a molécula de fitato (inositol hexafosfato, IP6) presente nos ingredientes das dietas, liberando fósforo, cálcio e outros nutrientes para o aproveitamento pelos animais (Hirvonen *et al.*, 2019; Sena *et al.*, 2020).

Em um estudo com frangos de corte expostos ao estresse térmico e suplementados com fitase (2000 FTU), Maynard *et al.* (2023) observaram melhorias no desempenho e redução na incidência de miopatia muscular.

Farias *et al.* (2020) avaliaram as respostas termorregulatórias, comportamentais e produtivas de galinhas poedeiras criadas em ambiente quente. Eles relataram que galinhas suplementadas com fitase na dieta apresentaram aumento na produção de ovos.

Outros estudos demonstraram os efeitos benéficos do uso da fitase no desempenho animal (Pirgozliev *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2021; Martínez-Vallespín *et al.*, 2022), na qualidade dos ovos, especialmente das cascas (Rojas *et al.*, 2017; Farias *et al.*, 2021), e nas características ósseas (Manobhavan *et al.*, 2016). Vale destacar que esses estudos foram realizados com frangos de corte e galinhas poedeiras. Nesse contexto, esta revisão bibliográfica buscou elaborar um documento que demonstre os efeitos benéficos da enzima fitase na degradação da molécula de fitato, na disponibilidade de cálcio para codornas japonesas (*Coturnix japonica*) e suas implicações frente ao estresse térmico.

2.4 CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix japonica*)

As codornas são aves originárias do norte da África, Ásia e Europa. Pertencem à ordem Galliformes e à família Phasianidae, que também inclui galinhas e perdizes, subfamília Pernicidae e gênero *Coturnix* (Pinto *et al.*, 2002; Vogado e Silva, 2023). São animais criados desde a antiguidade como aves canoras, decorativas e de luta (Lukanov e Pavlova, 2020). Os primeiros registros de domesticação datam do final do século XIX e início do século XX (Lukanov, 2019) quando os japoneses começaram a cruzar codornas europeias com espécies selvagens, resultando na criação da ave domesticada conhecida como *Coturnix japonica*, marcando assim o início de sua exploração (Pastore *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013).

No Brasil, a exploração comercial de codornas começou por volta de 1989, quando uma grande empresa avícola decidiu montar a primeira granja no sul do país, iniciando a exportação de carcaças de codorna congeladas (Silva *et al.*, 2012). Desde então, a atividade tornou-se muito relevante para a economia agropecuária brasileira.

Diversos atributos contribuíram para o aumento da produção de codornas no país, como o rápido crescimento das aves, precocidade na produção e maturidade sexual (35 a 42 dias), alta produtividade (média de 300 ovos/ano), longevidade em alta produção (14 a 18 meses), baixo investimento, rápido retorno financeiro (Pinto *et al.*, 2002; Vieira, 2014) e a necessidade de uma área pequena para produção (200–250 cm² no sistema de cama e 150–200 cm² no sistema de gaiolas) (Nasar *et al.*, 2016; Matos Júnior *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, a produção de ovos de codorna apresentou crescimento significativo, impulsionado pelo aumento do interesse dos consumidores por esse produto. Os ovos são reconhecidos como uma fonte alimentar completa e equilibrada, ricos em proteínas e com baixo teor de gordura. Além disso, sua fração lipídica contém altas concentrações de ácidos graxos insaturados (Sarcinelli *et al.*, 2007), conferindo-lhes alto valor biológico e tornando-os acessíveis aos consumidores (Carvalho *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2017).

Por muito tempo, no Brasil e em outros países tropicais, as dietas para codornas foram formuladas com base nos padrões do National Research Council—NRC (1994) e do Institut National de La Recherche Agronomique—INRA (1999), que se baseiam nos níveis nutricionais estabelecidos para galinhas poedeiras e/ou frangos de corte. No entanto, essa abordagem frequentemente resultava em dietas com excesso ou deficiência de nutrientes essenciais para codornas. Uma rara exceção a essa prática são as Tabelas de Recomendações Nutricionais para Codornas Japonesas e Europeias, desenvolvidas por Silva e Costa (2009) com base em experimentos realizados no Brasil.

As 4^a e 5^a edições das Tabelas Brasileiras de Exigências Nutricionais para aves e suínos, elaboradas por Rostagno *et al.* (2017; 2024), introduziram exigências específicas para codornas japonesas. Contudo, a crescente pesquisa sobre a nutrição de codornas poedeiras é de extrema importância. Isso se deve ao recente aumento nos custos de produção, especialmente dos ingredientes utilizados na alimentação de aves, tornando vital a adoção de estratégias nutricionais que maximizem o aproveitamento dos nutrientes, resultando em maior eficiência produtiva.

2.5 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA PRODUÇÃO DE CODORNAS JAPONESAS

Em condições de termoneutralidade (faixa de temperaturas onde a ave pode manter sua temperatura corporal com mínimo esforço), as aves requerem menos energia para manter a temperatura corporal estável, o que lhes permite direcionar a maior parte da energia proveniente da alimentação para processos produtivos e reprodutivos. Considerando a grande influência das condições ambientais, como temperatura e umidade relativa, sobre a produção e bem-estar das aves, é fundamental monitorar e gerenciar essas condições adequadamente para otimizar a produção (Silva, 2017).

A indústria avícola frequentemente enfrenta condições ambientais adversas, sendo a exposição ao estresse térmico uma das mais comuns. O estresse térmico (ET) ocorre quando a produção de calor de um animal ultrapassa sua capacidade de dissipá-lo para o ambiente (Kim *et al.*, 2023). Quando a temperatura ambiente excede a faixa de termoneutralidade (codornas poedeiras, 21 °C a 27 °C (Alagawany *et al.*, 2017), as aves tendem a reduzir sua atividade física e ingestão de alimento para controlar a produção de calor. Além disso, aumentam a ofegação e o consumo de água para facilitar a dissipação de calor por evaporação (Teyssier *et al.*, 2022).

A ofegação é um fenômeno exibido pelas aves quando abrem o bico para aumentar a taxa de respiração e o resfriamento evaporativo do trato respiratório. Durante a ofegação, a excreção de CO₂ ocorre mais rapidamente do que a produção celular de CO₂, o que altera o sistema padrão de tampão bicarbonato no sangue. A redução do CO₂ leva a uma diminuição na concentração de ácidos carbônicos (H₂CO₃) e íons hidrogênio (H⁺). Em contraste, a concentração de íons bicarbonato (HCO₃⁻) aumenta, elevando o pH do sangue, ou seja, o sangue se torna alcalino. Para gerenciar esse cenário e preservar o equilíbrio do pH sanguíneo, as aves iniciam um processo de excreção aumentada de íons bicarbonato (HCO₃⁻) e retenção de íons hidrogênio (H⁺) pelos rins. O aumento de H⁺ altera o equilíbrio ácido-base, levando à alcalose respiratória, e está associado a uma queda no desempenho produtivo das aves (Wasti *et al.*, 2020). No entanto, é importante observar que, embora os rins desempenhem um papel crucial na compensação da alcalose, a exposição prolongada a altas temperaturas pode resultar no desenvolvimento de uma condição conhecida como alcalose crônica (Linsley e Burger, 1967; Vercese, 2010).

Furlan *et al.* (1999) realizaram um estudo com cinco linhagens comerciais de frangos de corte. Submetendo-os ao estresse térmico, observaram que,

independentemente da linhagem, houve uma diminuição do conteúdo de CO₂ e um aumento do pH sanguíneo à medida que a temperatura aumentava (Vercese, 2010).

Ruzal *et al.* (2011) afirmam que a alcalose respiratória causada pela ofegação tem um efeito prejudicial sobre a qualidade dos ovos de galinhas poedeiras. A alcalose respiratória causa evidentemente um aumento do pH do sangue arterial associado a uma redução na pressão parcial de CO₂. Essa ação leva a uma queda nos níveis de bicarbonato no plasma e a um aumento da ligação entre ácidos orgânicos e o conteúdo de íons de cálcio, reduzindo a disponibilidade de íons de bicarbonato e de cálcio, prejudicando assim a qualidade dos ovos.

As codornas poedeiras também podem sofrer impactos em seu equilíbrio ácido-básico devido a períodos de calor intenso, resultando em desequilíbrios eletrolíticos e minerais, o que pode culminar em ovos menores e cascas mais finas. Esse fenômeno é atribuído principalmente à alcalose, que reduz a disponibilidade de cálcio livre no sangue e aumenta a proporção de cálcio ligado a proteínas ou complexado com ácidos orgânicos. Consequentemente, durante o estresse térmico, observa-se um aumento do pH sanguíneo devido à perda de dióxido de carbono, simultaneamente acompanhado por uma redução no cálcio disponível (Vercese, 2010).

Vercese *et al.* (2012) avaliaram o desempenho e a qualidade dos ovos de codornas japonesas submetidas ao estresse térmico cíclico e observaram que codornas expostas a uma temperatura de 27 °C já apresentavam sinais de estresse térmico, como redução na ingestão de alimentos, peso dos ovos e massa de ovos. O aumento cíclico da temperatura ambiente para 36 °C influenciou negativamente o percentual de ovos comercializáveis e a produção de ovos.

Ao avaliar o efeito do estresse térmico em codornas poedeiras (*Coturnix japonica*), Akdemir *et al.* (2019) afirmaram que aves submetidas a temperaturas de 34 °C apresentam menor ingestão de alimentos, menor produção e peso dos ovos, além de maior conversão alimentar.

Cruvinel *et al.* (2020), na avaliação de diferentes valores de equilíbrio eletrolítico na dieta de codornas japonesas (*Coturnix japonica*), encontraram que o estresse térmico afeta negativamente a força e densidade óssea, o desempenho e a qualidade dos ovos.

Em sua pesquisa com codornas poedeiras, Moraes *et al.* (2021) investigaram os efeitos do estresse térmico em comparação com as condições de

termoneutralidade. Eles destacaram que a exposição a altas temperaturas pode prejudicar significativamente o desempenho das aves, refletido na redução da ingestão de alimentos, ganho de peso vivo e eficiência. Além disso, observaram diminuição na produção de ovos, assim como na qualidade e espessura da casca dos ovos, devido à menor disponibilidade de íons de cálcio (Abdulkadir e Reddy, 2023).

Lesson e Summers (1991) afirmam que, sob condições de alcalose respiratória, ocorre uma redução na calcificação dos ovos e dos ossos, comprometendo o desempenho das aves e contribuindo para o aumento da incidência de problemas nas pernas, bem como para a produção de ovos com cascas finas. A alcalose limita a disponibilidade de ânions necessários para a formação de cristais de carbonato de cálcio na casca do ovo (Mongin, 1968) e, conseqüentemente, leva à baixa qualidade dos ovos. Segundo Campos (2000), esse resultado pode acarretar uma redução de 12% na espessura da casca do ovo (Vercese *et al.*, 2012).

Outro ponto é que, em situações de estresse devido a altas temperaturas (30–33 °C para codornas), há uma diminuição na presença do transportador de cálcio calbindin-D28k no íleo, ceco, cólon e útero das aves (Moraes *et al.*, 2021), o que resulta na deterioração da qualidade da casca do ovo nessas condições (Ebeid *et al.*, 2012). Esse fenômeno pode ser explicado pelo estresse térmico, que reduz a conversão da vitamina D3 em sua forma metabolicamente ativa, a 1,25 (OH)₂D3, essencial para a absorção e utilização do cálcio (Moraes *et al.*, 2021). Além disso, o estresse também diminui os padrões antioxidantes, levando à deficiência ou aumento das necessidades de vitaminas e minerais, especialmente zinco (Sahin *et al.*, 2009), considerado um íon cofator da enzima anidrase carbônica responsável pela deposição de cálcio na casca dos ovos (Melo *et al.*, 2016; Sena *et al.*, 2020).

2.6 FITASE E A HIDROLISE DO FITATO

O ácido fítico (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato), também conhecido como Inositol-6-fosfato (Figura 1), fitato em sua forma de sal (Kumar e Anand *et al.*, 2021), fitina ou fósforo fítico, é o principal sistema de armazenamento de fósforo em sementes de plantas, como grãos de cereais, nozes, sementes oleaginosas e leguminosas (Kim *et al.*, 2020; Kumar e Anand *et al.*, 2021). A Tabela 1 destaca os níveis de fitato em alguns alimentos utilizados na alimentação animal.

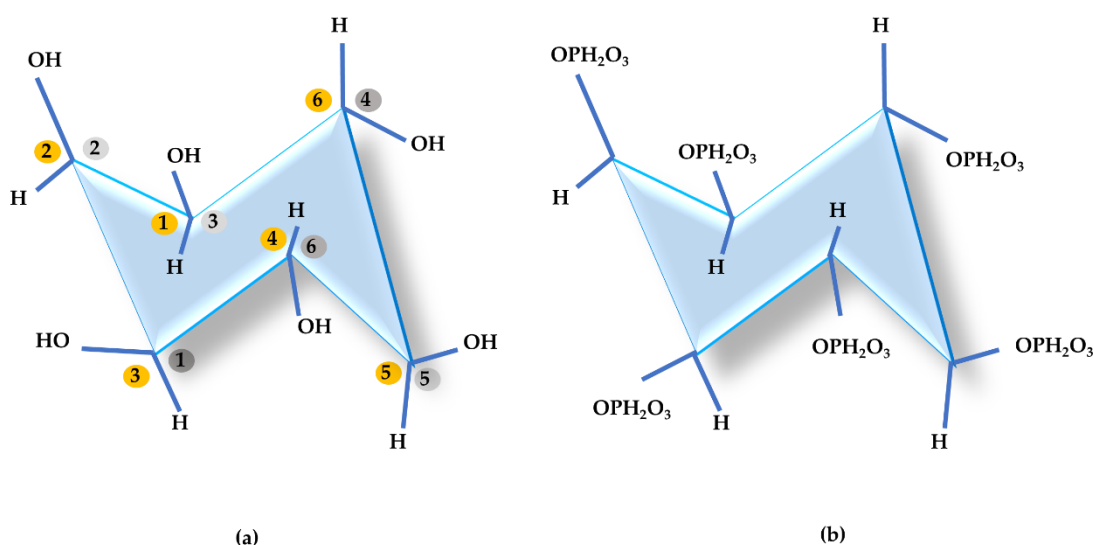


Figura 1 - *Myo-inositol* (a) e *myo-inositol* 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakis dihidrogênio fospódio (InsP6) (b).

Tabela 1. Teor de fítato nos alimentos (com base na matéria seca).

Produtos	Fitato, %	Referência
Milho	0,78–1,05	(Lehrfeld, 1989; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Soja	1,01–1,47	(Lolas <i>et al.</i> , 1976; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Sorgo	0,80	(Stein, 2023)
Farelo de algodão	2,65	(Stein, 2023)
Gérmen de milho	2,97	(Stein, 2023)
Arroz polido	0,60	(Ravindran <i>et al.</i> , 1994; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Aveia	0,79–1,01	(Lolas <i>et al.</i> , 1976; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Trigo	0,39–1,35	(Frossard <i>et al.</i> , 2000; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Farelo de soja	1,0–1,5	(Banaszkiewicz, 2011)
Farelo de arroz	5,90–6,48	(Kasim e Edwards, 1998; Canan <i>et al.</i> , 2011)
Farelo de trigo	5,38	(Lehrfeld, 1989; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Farinha de trigo integral	2,22	(García-Esteva <i>et al.</i> , 1999; Bloot <i>et al.</i> , 2021)
Farinha de trigo Branca	0,404	(García-Esteva <i>et al.</i> , 1999; Bloot <i>et al.</i> , 2021)

Aproximadamente 60–80% do fósforo na maioria dos grãos de cereais e oleaginosas está ligado ao fitato (Hu *et al.*, 2021), que é uma forma química de baixa disponibilidade para aves e suínos (Figueirêdo *et al.*, 2000). O fitato prende o fósforo e outras substâncias catiônicas, impedindo que sejam totalmente utilizados pelas aves (Payne *et al.*, 2005). De acordo com Woyengo e Nyachoti (2011), o ácido fítico contém 12 prótons ionizáveis com valores de pKa variando de 1,5 a cerca de 10 (Costello *et al.*, 1976; Vasconcelos, 2018). Portanto, em todos os valores de pH normalmente

observados ao longo do trato gastrointestinal, o fitato é capaz de se ligar a cátions, causando a indisponibilidade de minerais.

Além de tornar o fósforo indisponível, o fitato também influencia negativamente a digestão e absorção de outros minerais, aminoácidos e a utilização de energia das dietas (Gautier *et al.*, 2017). O fitato pode criar uma ampla variedade de sais insolúveis com cátions divalentes, como cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e manganês (Mn^{2+}) (Alves *et al.*, 2016), minerais considerados nutricionalmente importantes, especialmente para as galinhas poedeiras. Assim, as concentrações sanguíneas de fósforo e cálcio podem ser reduzidas, afetando negativamente os processos produtivos (Rezaeipour *et al.*, 2016). Além disso, o ácido fítico pode se ligar a proteínas e inibir a atividade de algumas enzimas digestivas, incluindo tripsina, pepsina e alfa-amilase (Lelis *et al.*, 2010).

A fitase ou *myo*-inositol hexafosfato fosfohidrolase é uma fosfatase comumente utilizada nas dietas de animais não ruminantes como uma forma de aumentar a biodisponibilidade do fósforo do fitato e de outros nutrientes (Hirvonen *et al.*, 2019). Esta enzima hidrolisa o ácido fítico e seus sais (fitato), produzindo inositol, inositol monofosfato e fósforo inorgânico (Jatuwong *et al.*, 2020), liberando fósforo e melhorando a disponibilidade de outros nutrientes ligados à molécula de fitato (Sena *et al.*, 2020b). A atividade dessa enzima é expressa em uma Unidade de Atividade de Fitase (FTU), que representa a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de fósforo inorgânico por minuto de reação a partir de fitato de sódio, a uma temperatura de 37 °C e pH de 5,5 (Kriseldi *et al.*, 2021).

A fitase catalisa a liberação de fosfato presente no fitato, produzindo então os compostos *myo*-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- e monofosfatos, além de fosfato inorgânico (Vats e Banerjee, 2004; Sato *et al.*, 2014) (Figura 2). As enzimas podem ser classificadas em diferentes classes de acordo com alguns critérios, incluindo a estereoespecificidade da hidrólise do fitato (número de carbono no anel de *myo*-inositol do fitato no qual a desfosforilação é iniciada), o pH ótimo (fitases ácidas ou alcalinas) e seu mecanismo catalítico (Dailin *et al.*, 2019).

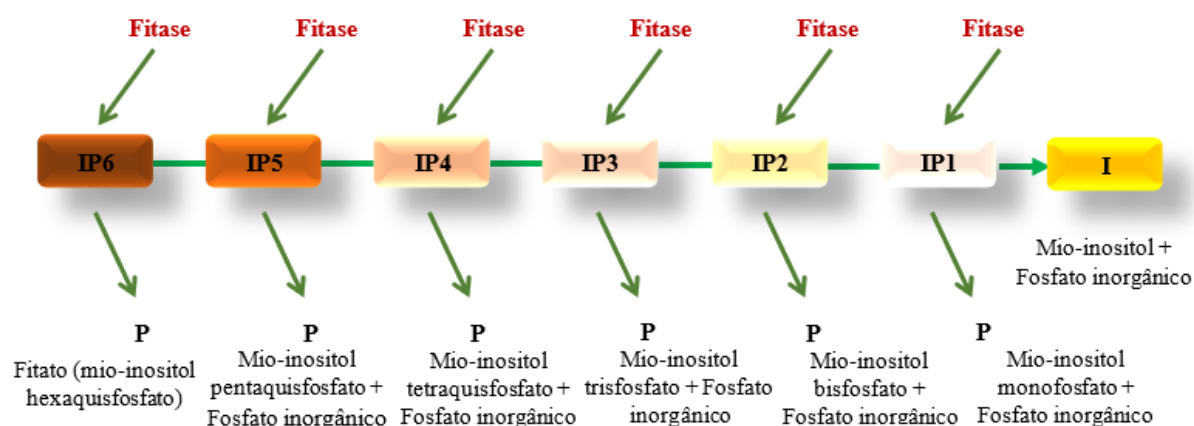


Figura 2 - Hidrólise da molécula de fitato através da ação da enzima fitase: I (inositol); P (fosfato); IP6 (myo-inositol hexakisphosphate); IP5 (myo-inositol pentakisphosphate); IP4 (myo-inositol tetrakisphosphate); IP3 (myo-inositol triphosphate); IP2 (myo-inositol bisphosphate); e IP1 (myo-inositol monophosphate).

Com base na estereoespecificidade, de acordo com a União Internacional de Bioquímica (UIB), atualmente três grupos de fitases podem ser distinguidos, dependendo da posição no anel de inositol onde a desfosforilação é iniciada, a saber: 3-fitases (EC 3.1.3.8), 6-fitases (EC 3.1.3.26) e 5-fitases (EC 3.1.3.72) (Greiner *et al.*, 2010; Bhavsar e Khire, 2014; Santos *et al.*, 2019), conforme mostrado na Figura 3.

Descrição das três fitases:

(a) **3-fitase (EC 3.1.3.8)**: Myo-inositol hexakisphosphate-3-fosfohidrolase, inicia a hidrólise da ligação éster na terceira posição do myo-inositol hexakisphosphate para myo-inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphate e ortofosfato, isolada de *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* sp. ASR1.

(b) **4-fitase**, também conhecida como 6-fitase (**EC 3.1.3.26**): Myo-inositol hexakisphosphate-6-fosfohidrolase, hidrólise a ligação éster na sexta posição do myo-inositol hexakisphosphate para myo-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphate e ortofosfato, isolada de plantas, *E. coli*, *Paramecium*.

(c) **5-fitase (EC 3.1.3.72)**: Myo-inositol-hexakisphosphate-5-fosfohidrolase, inicia a hidrólise da ligação éster na quinta posição do myo-inositol hexakisphosphate para myo-inositol-1,2,3,4,6-pentakisphosphate e ortofosfato, isolada de *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris* e *Pisum sativum*.

Dependendo do pH ótimo, as fitases podem ser classificadas como ácidas ou alcalinas, sendo ácidas quando seu pH está entre 2,5 e 6,0, e alcalinas quando seu pH é próximo de 8,0 (Greiner *et al.*, 2001; Naves *et al.*, 2012; Delmaschio, 2014). Com

base em suas diferenças estruturais e no seu mecanismo catalítico, as fitases podem ser classificadas em quatro grupos: fitases ácidas de histidina (HAPs), fitases β -hélice (BPPs), fitases de cisteína (CPs) ou fitases ácidas roxas (PAPs) (Dailin *et al.*, 2019; Nezhad *et al.*, 2020) (Figura 3).

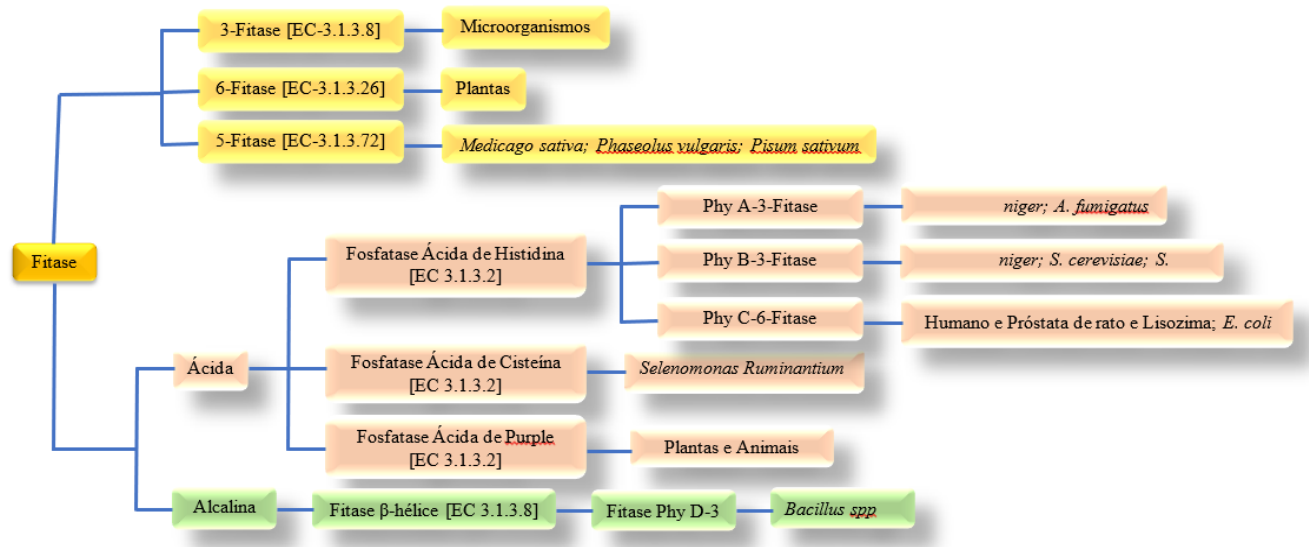


Figura 3 - Classificação das fitases.

2.7 SUPERDOSAGEM DE FITASE

Uma superdosagem de fitase refere-se à adição de fitase às dietas em níveis superiores aos recomendados (500 FTUs/kg) e pode até ser o dobro ou o triplo dessas recomendações. Tais dosagens têm sido utilizadas para combater eficazmente os efeitos antinutricionais do fitato, melhorando o desempenho dos animais (Pirgozliev *et al.*, 2011; Sena *et al.*, 2020b).

De acordo com Cowieson *et al.* (2011), existem três mecanismos principais pelos quais o uso de altas doses de fitase pode ter efeitos benéficos:

1. Maior quantidade de fosfato disponibilizado pela enzima ou maior proporção na liberação de cálcio e fósforo;
2. Menor excreção de fitato, ou seja, destruição do efeito antinutricional e aumento na geração de ésteres mais solúveis;
3. Geração de *myo*-inositol com efeitos vitamínicos/lipotrópicos.

Diversos estudos demonstram os efeitos relevantes do uso de superdosagem de fitase em dietas de frangos de corte: Nelson *et al.* (1971) utilizaram de 1 a 8 g de

uma fitase proveniente de *Aspergillus ficum* com 950 FTUs/kg na dieta de frangos de corte (950 e 7600 FTUs/kg de ração). Esses autores avaliaram que, aparentemente, 38,9% do fitato foi degradado ao utilizar a concentração de 950 FTUs/kg da enzima e 94,4% ao utilizar 7600 FTUs/kg, com maiores respostas para ganho de peso e cinzas ósseas em frangos de 21 dias de idade quando se utilizou 7600 FTUs/kg de fitase nas dietas (Cowieson *et al.*, 2011; Sena *et al.*, 2020b).

Ao avaliar os efeitos extra-fosfóricos da superdosagem de uma fitase microbiana produzida por *E. coli*, Walk *et al.* (2013) observaram uma melhor conversão alimentar em frangos de corte alimentados com 1500 FTUs/kg de fitase na dieta, com uma redução de 0,16% no Ca e 0,15% no P. De acordo com esses autores, esses achados podem estar relacionados à redução dos fatores antinutricionais do fitato quando a enzima é utilizada na dieta.

Avaliando os efeitos da superdosagem de fitase (SUNPHASE 5000 G) na digestibilidade e no desenvolvimento ósseo de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade, Fernandes *et al.* (2019) observaram um efeito quadrático da inclusão de fitase sobre o diâmetro e a porcentagem de Ca e P no fêmur, em que as inclusões de 1494 e 1220 FTUs, respectivamente, apresentaram os melhores resultados. Na avaliação da tíbia, o diâmetro, comprimento e peso aumentaram de forma linear com a inclusão de fitase, e, para a resistência, foi observado um efeito quadrático, sendo 1265 FTUs o melhor nível.

Em um estudo com quatro fontes comerciais de fitase suplementadas em níveis regulares (250 e 500 FTUs/kg) e superdosagem (1000, 1500 e 2000 FTUs/kg) sobre o desempenho produtivo, mineralização óssea e energia ileal digestível aparente em frangos de corte de 7 a 24 dias de idade, Leyva-Jimenez *et al.* (2019) relataram que, nos dias 14 e 22, todas as fontes de fitase melhoraram ($p < 0,05$) o peso corporal, o ganho de peso e a mineralização óssea em comparação com aves alimentadas com a dieta controle negativa. De modo geral, a suplementação de fitase no nível S melhorou a digestibilidade ileal aparente em 17% aos 24 dias. Durante todo o período de crescimento, a superdosagem de fitase proporcionou ($p < 0,05$) melhor desempenho, características ósseas e digestibilidade energética em comparação aos níveis regulares na dieta. Em conclusão, todas as fontes de fitase foram capazes de compensar a deficiência de fósforo e promover o desempenho e a mineralização óssea. Níveis mais altos de fitase apresentaram uma resposta superior em relação aos níveis mais baixos de suplementação.

Dado os resultados satisfatórios obtidos com frangos de corte, há um interesse crescente nos resultados com poedeiras, considerando que o uso de Ca e P em poedeiras é provavelmente mais importante do que em frangos de corte (Kim *et al.*, 2017), devido à maior necessidade desses minerais na formação das cascas dos ovos (Sena *et al.*, 2020b).

Ao avaliar os efeitos da superdosagem (450 FTUs ou 900 FTUs) de duas fitases (bacteriana ou fúngica) sobre o desempenho, qualidade dos ovos, biometria dos órgãos digestivos e qualidade óssea de poedeiras leves no primeiro (58 semanas) e segundo (87 semanas) ciclos de produção, Farias *et al.* (2021) concluíram que a fitase bacteriana produzida por *Escherichia coli*, na dosagem de 450 FTUs, melhorou a produção de ovos de poedeiras leves. De acordo com esses autores, o uso de fitase na dieta de poedeiras implica em menores custos com alimentação.

Ao avaliar os efeitos de uma superdosagem (0; 500; 1000; 1500; e 3000 FTUs) de fitase sobre os parâmetros ósseos e a concentração do transportador epitelial de cálcio Calbindin-D28k em codornas japonesas, Ribeiro *et al.* (2024) observaram que a superdosagem de fitase não apenas aumentou a eficiência de absorção de cálcio, mas também estimulou uma maior expressão de Calbindin-D28K no duodeno e no jejuno das aves. Essa ação resultou em uma melhor mobilização de cálcio para as tíbias e aumento na produção de ovos. Além disso, a suplementação com 1500 FTUs de fitase reduziu os efeitos negativos do estresse térmico a 36 °C, aumentando a espessura da casca dos ovos. Esses estudos destacam a importância da superdosagem de fitase como uma estratégia eficaz para melhorar a saúde e a produtividade das aves em condições de estresse térmico por calor.

2.8 PAPEL DA FITASE NA REDUÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR

Como já bem documentado, o estresse térmico influencia o desempenho de poedeiras, assim como em qualquer sistema de produção, constituindo uma das principais causas de perdas produtivas em regiões tropicais e subtropicais (Saeed *et al.*, 2019). Fatores como horário do dia, genótipo, sistema de criação e densidade animal interferem nas respostas termorregulatórias, levando a mudanças no comportamento natural das aves (Sena *et al.*, 2020a).

Estratégias nutricionais são amplamente utilizadas para reduzir os efeitos negativos do estresse térmico, como ajustar os níveis de proteína e/ou energia nas dietas, incluir gorduras ou óleos, suplementar com aminoácidos sintéticos, utilizar vitaminas e oferecer água potável com aditivos minerais (Farag e Alagawany, 2018). O uso de enzimas exógenas, como a fitase, na dieta das aves se destaca como uma dessas estratégias nutricionais implementadas para superar os efeitos causados pelo estresse térmico, resultando em melhor bem-estar animal (Sena *et al.*, 2020a). Como as aves não produzem enzimas fitase suficientes para hidrolisar a molécula de fitato presente nos ingredientes da ração, a introdução dessa enzima em suas dietas é necessária, uma vez que a fitase catalisa a hidrólise do ácido fítico, eliminando suas propriedades antinutricionais (Lelis *et al.*, 2010), promovendo assim a liberação do fósforo fítico presente nos alimentos vegetais, além de tornar outros minerais, como cálcio e vitaminas, disponíveis e aumentar a digestibilidade dos nutrientes nas dietas (Farias *et al.*, 2020).

A fitase também tem efeitos extra-fosfóricos, como a liberação de proteínas, aminoácidos, carboidratos, minerais e vitaminas que estão complexados à molécula de fitato (Dersjant-Li *et al.*, 2014), além de melhorar a utilização da energia dietética pelas aves (Leyva-Jimenez *et al.*, 2019). A enzima fitase também foi reconhecida por facilitar a disponibilidade de zinco (Freeland-Graves *et al.*, 2015). De acordo com Borges (2008), este mineral é incorporado em algumas formulações dietéticas para reduzir os efeitos do estresse térmico nas aves, promovendo uma melhor absorção de nutrientes durante períodos de estresse, o que pode reduzir perdas, especialmente as perdas de energia.

De acordo com Hu *et al.* (2023), em temperaturas elevadas, a atividade das enzimas é fortemente afetada nas aves. Há uma mudança significativa na atividade das enzimas metabólicas no corpo, o que aumenta a taxa metabólica e, consequentemente, a produção de radicais livres. O excesso de radicais livres prejudica o equilíbrio oxidativo e antioxidante do corpo, levando à peroxidação lipídica, danos ao DNA e às proteínas, e à geração de estresse oxidativo.

O dano oxidativo à membrana celular pelos radicais livres ocorre durante a deficiência de zinco, alterando assim o status das enzimas e das substâncias antioxidantes (Kazim e Omer, 2003). O zinco (Zn) é um mineral essencial encontrado nas aves, predominantemente nos ossos e no fígado. Ele desempenha um papel essencial no crescimento e no funcionamento adequado do sistema imunológico das

aves. Além disso, o zinco contribui para o desenvolvimento das aves, melhora a eficiência de conversão alimentar, fortalece a imunidade e ajuda a prevenir doenças (Hu *et al.*, 2023).

O zinco é necessário para a atividade de mais de 300 enzimas e participa de várias funções enzimáticas e metabólicas no corpo (Prasad e Kucuk, 2002). Uma das funções mais importantes do Zn é sua participação no sistema de defesa antioxidante. A deficiência de zinco aumenta o dano oxidativo às membranas celulares causado pelos radicais livres (Sahin *et al.*, 2009; Prasad e Kucuk, 2002). O Zn exerce sua ação antioxidante aumentando a síntese de metalotioneína, uma proteína rica em cisteína, que age como um captador de radicais livres (Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013). Outro modo proposto de ação do Zn como antioxidante é sua interação com a vitamina E, pois o status de vitamina E é prejudicado em animais com deficiência de zinco (Sahin *et al.*, 2009). Além disso, o zinco pode ocupar os sítios de ligação de ferro e cobre em lipídios, proteínas e DNA, exercendo assim uma ação antioxidante direta (Kazim e Omer, 2003). Além disso, o zinco aumenta a capacidade antioxidante nas aves, aumentando a atividade da superóxido dismutase cobre-zinco e das metaloproteínas de zinco, além de alterar o DNA e a estrutura da cromatina para influenciar a expressão gênica (Hu *et al.*, 2023).

Outro ponto relacionado à importância da enzima fitase na disponibilidade de zinco nas dietas de aves submetidas ao estresse térmico é que esse mineral é um cofator da enzima anidrase carbônica, que desempenha um papel vital na formação da casca do ovo (Ribeiro *et al.*, 2024). Além disso, o zinco pode ser incorporado na fase de crescimento durante a formação do cristal de calcita (Zhang *et al.*, 2017). A anidrase carbônica é uma enzima que catalisa a hidratação do CO₂ metabólico para HCO₃⁻, o precursor do carbonato da casca do ovo. Vários estudos relataram que a inibição parcial ou completa da anidrase carbônica pode resultar em ovos com casca fina ou sem casca (Benesch *et al.*, 1944; Zhang *et al.*, 2017). Também foi relatado que a qualidade da casca do ovo é reduzida pela inibição da atividade da anidrase carbônica ou pela expressão do mRNA da anidrase em poedeiras (Nys *et al.*, 1999; Holm *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2017).

Estudos demonstraram os efeitos positivos do uso de fitase na ração de aves sob estresse térmico: Mohebbifar *et al.* (2015) investigaram os efeitos da suplementação de fitase (0 e 150 FTUs) em dietas com diferentes níveis de farelo de arroz e fósforo não fítico sobre o desempenho produtivo, qualidade dos ovos, perfil de

leucócitos e lipídios séricos em poedeiras criadas sob altas temperaturas ambientais. Eles descobriram que dietas com alto teor de fitato (como aquelas ricas em farelo de arroz) e/ou baixo fósforo não fítico (2,5 g/kg), quando suplementadas com fitase, resultaram em melhorias significativas no desempenho e na qualidade dos ovos das aves submetidas ao estresse térmico.

Ao avaliar os efeitos simples e combinados de fitase e ácido cítrico sobre o desempenho, digestibilidade de nutrientes, características ósseas, morfologia intestinal e parâmetros sanguíneos de codornas japonesas (com idades de 1 a 35 dias) alimentadas com dietas com baixo fósforo, Hezaveh *et al.* (2020) descobriram que a suplementação com fitase resultou em melhorias significativas. Houve um aumento no desempenho das aves, nos coeficientes de digestibilidade de proteína, cinzas e fósforo, na energia metabolizável, na mineralização óssea e na morfologia intestinal, mesmo com uma redução de 0,12% no fósforo não fítico da dieta.

Ao avaliar os níveis de fitase (0; 200; 400 e 600 FTUs/kg) na dieta sobre o desempenho e a qualidade dos ovos de codornas japonesas submetidas ao estresse térmico, Lima *et al.* (2011) concluíram que o uso de fitase melhorou o desempenho e a qualidade dos ovos das aves. O melhor nível de fitase para uma melhor eficiência no uso de fósforo pelas aves e para uma melhor massa de ovos foi de 463 FTUs/kg.

Ao avaliar os efeitos de uma superdosagem de fitase sobre os parâmetros ósseos e a concentração do transportador epitelial de cálcio Calbindin-D28k em codornas japonesas sob estresse térmico, Ribeiro *et al.* (2024) demonstraram que a suplementação com fitase trouxe benefícios para as aves, especialmente aquelas mantidas a temperaturas de 30 °C, devido à maior demanda por vitaminas e minerais, em função das mudanças em seu metabolismo. A fitase melhorou a eficiência de absorção de cálcio e influenciou positivamente o aumento da expressão de Calbindin-D28K no duodeno e jejuno das aves. Essa ação proporcionou uma maior mobilização de cálcio para as tíbias e uma maior produção total de ovos para as aves mantidas nessa temperatura. Além disso, esses resultados demonstram que a suplementação dietética com fitase a um nível de 1500 FTUs foi capaz de reduzir os efeitos deletérios do estresse térmico (36 °C) e influenciou positivamente o aumento da espessura da casca dos ovos de codorna.

Neste contexto, pode-se observar que o uso de fitase pode influenciar positivamente a redução dos efeitos do estresse térmico e de fatores antinutricionais, como o fitato, em codornas japonesas.

2.9 CÁLCIO E FÓSFORO NA DIETA DE CODORNAS POEDEIRAS (*Coturnix japonica*)

De acordo com a prática atual, as dietas para codornas poedeiras comerciais são formuladas com base nas recomendações das Tabelas de Requisitos Nutricionais Específicas para cada linhagem, como as edições 4 e 5 das Tabelas Brasileiras de Exigências Nutricionais para Aves e Suínos, elaboradas por Rostagno *et al.* (2017; 2024), pelo National Research Council (1994) e pelo Agriculture and Food Research Council (AFRC) (Euzébio e Santos, 2021). A redução da densidade de nutrientes como o fósforo na ração e o uso de suplementação com fitase podem reduzir o custo total da dieta, contribuindo assim para a rentabilidade da produção de ovos (Gouveia *et al.*, 2022).

O cálcio (Ca) e o fósforo (P) são essenciais para codornas poedeiras, e sua disponibilidade é particularmente crucial durante o período de postura (Ribeiro *et al.*, 2016). Entre todos os minerais, o cálcio e o fósforo desempenham o papel mais fundamental na construção do esqueleto, compondo de 80 a 85% de sua estrutura. Esses minerais são essenciais na formação das cascas de ovos e no desenvolvimento muscular. Assim, são indispensáveis para o funcionamento adequado do corpo do animal (Stanquevis *et al.*, 2021).

O cálcio é o mineral mais abundante no organismo animal, representando uma proporção corporal de 1:75 (Souza *et al.*, 2017). A maior parte do cálcio (99%) está presente nos ossos (Lautrou *et al.*, 2020; David *et al.*, 2023) na forma de hidroxiapatita, uma estrutura cristalina inorgânica composta por cálcio e fósforo $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (Souza *et al.*, 2017). Durante os processos de absorção, metabolismo e excreção, cálcio e fósforo interagem, mantendo uma proporção de aproximadamente 2:1 (Pelicia *et al.*, 2009). Além de compor a estrutura óssea, o cálcio também está presente nos tecidos moles (1%), onde desempenha várias funções, como ativação de enzimas, transmissão de estímulos nervosos e participação no processo de coagulação sanguínea (Souza *et al.*, 2017).

O uso do cálcio pelo corpo da ave varia principalmente com a idade. Durante o período de crescimento das poedeiras, a maior parte do cálcio da dieta é direcionada para a formação dos ossos (Souza *et al.*, 2017). Em contrapartida, na fase adulta, o cálcio é predominantemente utilizado para a produção de ovos, especificamente para

a formação da casca (Stanquevis *et al.*, 2021). O cálcio necessário para a formação da casca, que vem da reabsorção óssea e da absorção intestinal, é transportado pelo sangue até a câmara calcígena (Carvalho e Fernandes, 2013; Souza *et al.*, 2017). Esse transporte é mediado pela atividade da anidrase carbônica, uma enzima crucial na formação da casca do ovo (Zhang *et al.*, 2017).

Aproximadamente 30% do cálcio necessário para a formação da casca do ovo é mobilizado dos ossos. Essa taxa ocorre porque, no útero, onde o carbonato de cálcio é depositado, não há armazenamento de cálcio. A fração orgânica da casca é sintetizada pelas glândulas, e o cálcio é mobilizado diretamente do sangue, com a transferência do plasma para o útero ocorrendo muito rapidamente (Mello, 2015; Souza *et al.*, 2017).

Os sintomas mais evidentes da deficiência de cálcio em aves jovens incluem crescimento retardado, redução do consumo de ração e fragilidade óssea (Souza *et al.*, 2017). Em aves adultas, a deficiência se manifesta em menor produção de ovos, ovos com casca fina e redução do conteúdo de cinzas e cálcio nos ossos (Chaves Hernández, 2014; Zhao *et al.*, 2020).

O fósforo, por sua vez, desempenha um papel crucial tanto na absorção quanto no metabolismo do cálcio (Serna e Bergwitz, 2020). Mais de 80% do fósforo está associado ao cálcio na formação óssea, enquanto o restante está presente em tecidos moles (Adedokun e Adeola, 2013; IFP, 2024). Suas funções incluem participação na estrutura óssea (hidroxiapatita), nas membranas celulares na forma de fosfolipídios (lecitina), como fosfato nas moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), e na forma de moléculas de energia, como adenosina difosfato (ADP) e trifosfato (ATP) (Adedokun e Adeola, 2013; Serna *et al.*, 2020).

O esqueleto funciona como um reservatório de cálcio e fósforo no corpo, e essa função é especialmente crucial em galinhas poedeiras, uma vez que a casca do ovo contém aproximadamente 10% do cálcio total no corpo da ave (Souza *et al.*, 2017). Portanto, há uma alta demanda por cálcio para manter a homeostase sanguínea enquanto a casca está sendo formada (Sinclair-Black *et al.*, 2024). Mecanismos fisiológicos regulam a integridade esquelética em resposta às diferentes necessidades durante a vida produtiva das galinhas poedeiras. A importância relativa do intestino e dos ossos como fontes de cálcio depende da concentração desse mineral na dieta (Mazzuco, 2005; Souza *et al.*, 2017).

De maneira geral, existem barreiras intestinais, como condições físico-químicas, pH e viscosidade, que dificultam a absorção da maioria dos minerais (Miranda, 2010). Portanto, os níveis dietéticos de cálcio e fósforo muitas vezes são superiores às necessidades reais, resultando em uma menor taxa de utilização e impacto ambiental devido ao excesso de excreção (Bertechini, 2012).

Para garantir a qualidade da casca do ovo, os níveis de cálcio e fósforo na dieta devem atender às necessidades nutricionais das aves (Silva, 2011). É importante observar que essas necessidades podem variar dependendo do tipo de codorna (japonesa ou europeia), sexo, idade e finalidade da granja, seja para a produção de ovos para consumo, incubação ou para carne (Albino e Barreto, 2003).

Vários estudos estão sendo conduzidos para estabelecer informações precisas sobre as necessidades nutricionais das codornas japonesas, com o objetivo de alcançar o máximo desempenho produtivo e manter a saúde. A Tabela 2 apresenta os valores recomendados de cálcio e fósforo disponível, propostos por diferentes autores para codornas japonesas na fase de postura.

Tabela 2. Recomendações de cálcio disponível (Ca) e fósforo (P) para codornas japonesas.

Idade—Semanas	Ca (%)	P (%)	Literatura
6–16	3,50	0,45	(Pedroso <i>et al.</i> , 1999)
6–29	2,00–3,05	-	(Masukawa <i>et al.</i> , 2001)
6–19	3,51	-	(Brandão <i>et al.</i> , 2007)
8–21	2,50	0,31	(Costa <i>et al.</i> , 2007)
45–57	3,50	0,15	(Costa <i>et al.</i> , 2010a)
45–57	3,80	-	(Costa <i>et al.</i> , 2010b)
7–54	2,50	0,25	(Silva, 2011)
12–42	2,50	0,35	(Amoah <i>et al.</i> , 2012)
26–38	2,00	0,31	(Vieira <i>et al.</i> , 2012)
21–36	3,10	0,32	(Nascimento, 2013)
7–20	2,50	0,35	(Aguda <i>et al.</i> , 2015)
8–56	2,99	0,31	(Rostagno <i>et al.</i> , 2017)
6–57	2,0–3,8	0,15–0,45	(Souza <i>et al.</i> , 2017)
20–32	-	0,39–0,44	(Nascimento <i>et al.</i> , 2019)
9–24	2,68	0,38	(Stanquevis <i>et al.</i> , 2021)
8–56	3,01–3,04	0,31–0,80	(Rostagno <i>et al.</i> , 2024)

As variações nas recomendações de cálcio (Ca) e fósforo disponível (P) para codornas japonesas decorrem de vários fatores, como a fonte e a biodisponibilidade dos minerais, a idade das aves, a eficiência de absorção e os níveis de energia das dietas.

2.10 ABSORÇÃO DE CÁLCIO (Ca)

A absorção ativa e a reabsorção de Ca são de grande importância para manter a homeostase deste mineral em várias funções fisiológicas (Yang *et al.*, 2011; Yu e Sharma, 2023). Também é essencial para a formação da hidroxiapatita esquelética e para a mineralização dos ossos, além de atender à alta demanda de Ca no útero (onde a casca do ovo é formada) para a calcificação do ovo em codornas poedeiras (Bianco *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2009).

Nas linhagens comerciais modernas de codornas poedeiras, cerca de 2–3 g de Ca (equivalente a 10% do cálcio total do corpo) são transferidos diariamente para deposição na casca do ovo (Ribeiro *et al.*, 2016; Sugiyama). A maior fonte de Ca provém da absorção dietética no intestino, reabsorção renal e reservas ósseas (Yang *et al.*, 2011).

As concentrações plasmáticas de Ca são controladas de forma precisa dentro de uma faixa estreita de variação, tanto intracelular quanto extracelular, por meio de mecanismos interativos entre o hormônio paratireoideano (PTH), calcitonina (CT), 1,25 diidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃) e estrogênio, e seus respectivos receptores localizados no intestino, ossos e rins (Souza *et al.*, 2017). Em resposta a baixos níveis de Ca²⁺ no sangue, as células da paratireoide liberam rapidamente o PTH, que estimula a reabsorção óssea ao liberar cálcio da matriz óssea para a circulação e também promove a reabsorção nos rins. Essas ações ajudam a restaurar as concentrações de Ca²⁺ no soro. Em situações crônicas, o PTH aumenta a produção de 1,25(OH)₂D₃ para facilitar a absorção intestinal de Ca²⁺ (Chang *et al.*, 2008).

Entre os diversos mecanismos destinados a reduzir o cálcio circulante, o fitato pode ser destacado como um deles, pois possui um poder quelante sobre vários cátions divalentes, principalmente o cálcio, tornando-o menos disponível (Schoultens *et al.*, 2003; Rezaeipour *et al.*, 2016).

Existem dois mecanismos para a mobilização do cálcio depositado nos ossos. O primeiro é representado pela transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o fluido intersticial, do qual o cálcio passa para o sangue. Esse mecanismo é considerado puramente físico e ocorre principalmente nos ossos esponjosos. O segundo mecanismo, que possui uma ação mais lenta sobre o tecido ósseo, utiliza o

hormônio paratireoideano (PTH) produzido na glândula paratireoide (Gobesso *et al.*, 2021). O PTH aumenta o número de osteoclastos e a reabsorção da matriz óssea (Silva e Bilezikian, 2015), liberando fosfato de cálcio e aumentando a calcemia (Moe, 2008), além de atuar nos rins, diminuindo a excreção de fósforo e estimulando a síntese da vitamina D ativa (McDowell, 2003). A atividade de secreção do hormônio paratireoideano é regulada em resposta às flutuações na concentração de cálcio (Pinheiro, 2009; Souza *et al.*, 2017).

A calcitonina é outro hormônio que atua no metabolismo do cálcio para manter os níveis normais no plasma sanguíneo. Ela é produzida pelas células parafoliculares da glândula tireoide e age inibindo a reabsorção da matriz óssea e, consequentemente, a mobilização do cálcio ósseo. Sua secreção é estimulada quando os níveis de cálcio no sangue estão elevados (Underwood e Suttle, 1999; Naot *et al.*, 2019).

As linhagens comerciais modernas de poedeiras podem produzir cerca de 300 ovos por ano, o que requer uma quantidade de cálcio equivalente a mais de 20 vezes o seu peso corporal total anualmente (Cross e Peterlik, 1988; Sugiyama e Kusuhara, 2001). Portanto, as poedeiras devem absorver uma grande quantidade de cálcio para atender à demanda dessa produção. A absorção de cálcio epitelial envolve dois caminhos distintos: o transporte transcelular ativo de cálcio e a difusão via o caminho paracelular (Yang *et al.*, 2011).

No intestino de mamíferos, o transporte transcelular de cálcio desempenha um papel importante na homeostase do cálcio, sendo um processo de três etapas: a entrada passiva de cálcio no enterócito via TRPV6; o transporte citoplasmático de cálcio ligado à proteína calbindin-D9k; e, nas aves, a proteína análoga é a calbindin-D28k; e a extrusão de cálcio através da membrana basolateral via Ca^{2+} -ATPase (PMCA 1b) e/ou trocador Na–Ca. Um mecanismo semelhante existe em tecidos como o rim, útero e placenta (Yang *et al.*, 2011; Hirnet *et al.*, 2003; Belkacemi *et al.*, 2005; Hoenderop *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Lee e Jeung, 2007; Suzuki *et al.*, 2008).

O rim também desempenha um papel essencial no equilíbrio do cálcio, regulando a excreção de cálcio do corpo. Para atender à necessidade de calcificação da casca do ovo, o cálcio filtrado no glomérulo é amplamente reabsorvido à medida que passa pelos néfrons (Hoenderop *et al.*, 2005; Lambers *et al.*, 2006).

A formação do ovo nas codornas poedeiras é um processo complexo, que depende da maturação do óvulo no ovário, da passagem do ovócito maduro pelo

oviduto via infundíbulo, da adição de albumina no magno, da síntese da membrana no istmo e da deposição da casca no útero. Os componentes minerais da casca nas codornas poedeiras são compostos principalmente por carbonato de cálcio e, em menor grau, por carbonato de magnésio e fosfato tricálcico. A deposição inicial dos minerais ocorre no istmo, onde a membrana da casca é formada. A calcificação da casca no útero leva cerca de 20 horas, durante as quais 2 g de cálcio são depositados (Burley e Vadhera, 1989).

A função dos diferentes tipos celulares do útero e das glândulas tubulares não estão claramente definidas, mas estão implicadas no processo de secreção de Ca. Alta concentração de cálcio-ativado ATPase é localizado principalmente nas microvilosidades das células das glândulas tubulares do útero (Yamamoto, 1985). Apesar da via de absorção e reabsorção de cálcio ser fisiologicamente conhecida, não há estudos que visem a elucidação da absorção, reabsorção e deposição de cálcio no útero, incluindo seus sítios e expressão, em codornas, sendo também escassos na avicultura em uma forma geral.

2.11 TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE CÁLCIO MEDIADO POR TRPV6 E CALBINDIN-D28K

Os epitélios desempenham um papel fundamental como revestimentos em vários compartimentos biológicos, onde criam superfícies especializadas para funções essenciais, como proteção, secreção, absorção e reabsorção de substâncias (Ali *et al.*, 2020). Por exemplo, a capacidade das células epiteliais de regular a absorção e secreção de íons vitais, como o cálcio, desempenha um papel crucial na manutenção do equilíbrio eletrolítico, garantindo assim os processos adequados de várias funções vitais no corpo (Tang e Goodenough, 2003; Hoenderop *et al.*, 2005; Clemente-Suárez *et al.*, 2023).

A absorção e reabsorção de cálcio no corpo ocorrem através do epitélio de vários órgãos, como os intestinos, rins, glândulas mamárias e placenta. Esse processo é mediado por uma sequência complexa de eventos regulados por diferentes fatores, como pH, concentrações extracelulares de cálcio e hormônios (Friedman e Gesek, 1995; Hoenderop *et al.*, 2005). Existem duas principais vias descritas para o transporte de cálcio através dos epitélios: a via paracelular, que permite o movimento de íons através dos espaços entre as células, e a via transcelular, na qual os íons são

transportados através do citoplasma das células epiteliais. Na via transcelular, o transporte de cálcio ocorre por meio de um processo que envolve várias etapas, incluindo a entrada de cálcio na célula através da membrana apical, a translocação do cálcio através do citoplasma até a membrana basolateral e, finalmente, a liberação de cálcio para a corrente sanguínea (Hoenderop *et al.*, 2005) (Figura 4).

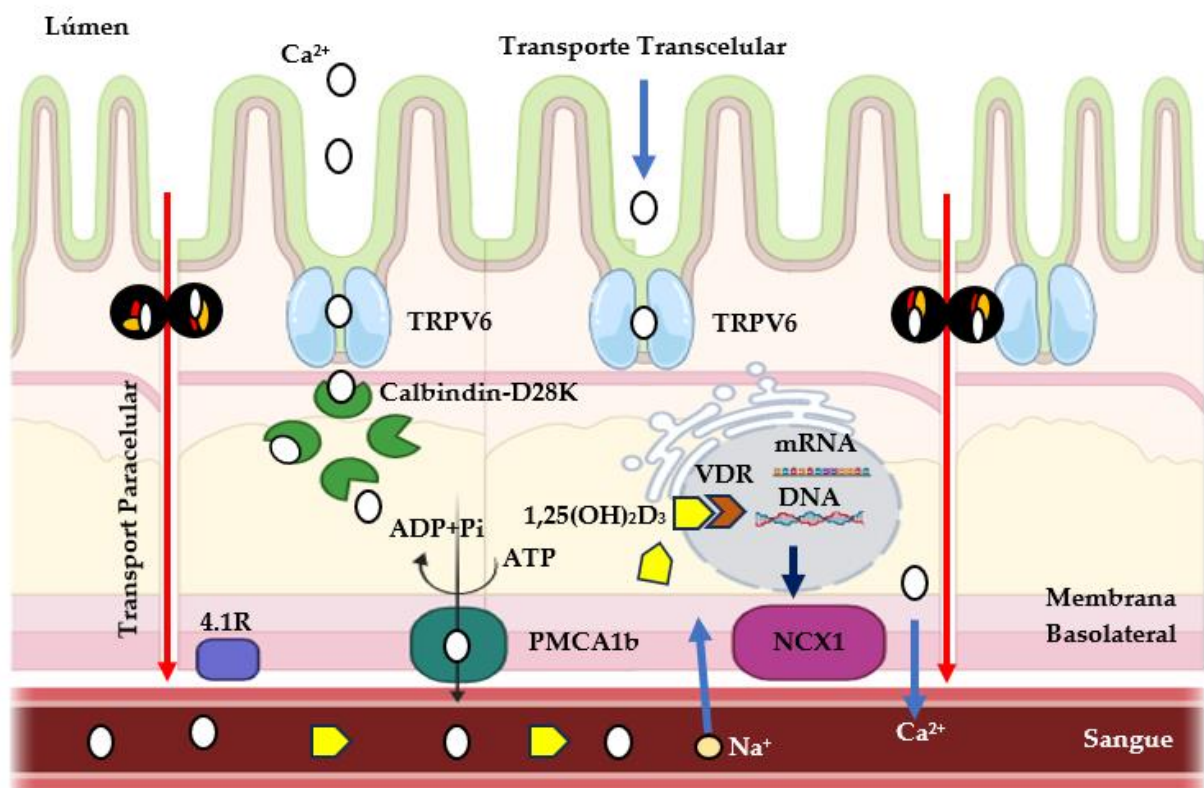


Figura 4. Desenho esquemático do transporte transepitelial de cálcio. Modelo integrado de transporte ativo de Ca^{2+} epitelial. O Ca^{2+} entra na célula a partir do lado luminal via TRPV6, subsequentemente se liga à calbindin-D28K, e é extrusado na membrana basolateral por um intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) e/ou uma Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA1b). A forma ativa da vitamina D [1,25(OH) $_2$ D $_3$] estimula as etapas individuais do transporte transcelular de Ca^{2+} aumentando o nível de expressão de TRPV6, calbindin-D28K e dos sistemas de extrusão. TRPV6 (canal do receptor potencial transitório do tipo vaniloide 6); VDR (receptor de vitamina D).

A entrada de cálcio nas células epiteliais ocorre por meio de canais localizados na membrana apical, conhecidos como TRPV5 e TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid), anteriormente chamados de ECaC1 e ECaC2, respectivamente. Essas

proteínas pertencem à família de canais conhecidos como Receptores Potenciais Transitórios do Tipo Vaniloide, especificamente agrupados na subfamília Vaniloide (Hoenderop *et al.*, 2005), que inclui seis componentes, sendo que apenas os subtipos TRPV 5 e 6 possuem capacidade de transporte de cálcio (Peng *et al.*, 2018).

O canal iônico TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid Channel Type 6) (Figura 5) funciona como um canal de cálcio epitelial no intestino, rim, osso, pele, placenta e glândulas exócrinas de mamíferos, que são tecidos caracterizados por uma alta demanda de transporte de cálcio (Nijenhuis *et al.*, 2003; Hoenderop *et al.*, 2005).

O TRPV6 é descrito como tendo um efeito facilitador na entrada de cálcio (Ca) nas células epiteliais, com uma correlação significativa entre a expressão do TRPV6 e o transporte de cálcio (Brown *et al.*, 2005; Bianco *et al.*, 2007), sendo esse canal iônico dependente da vitamina D (Bar, 2009). Observações sugerem que o TRPV6 é um importante regulador da entrada de cálcio e da homeostase (Bianco *et al.*, 2004; Bianco *et al.*, 2007). Este canal iônico é expresso nos epitélios de absorção e reabsorção, ou seja, no intestino e nos rins; no entanto, há pouca informação sobre o padrão de expressão do TRPV6 em galinhas poedeiras (Yang *et al.*, 2011) e nenhuma para codornas poedeiras.

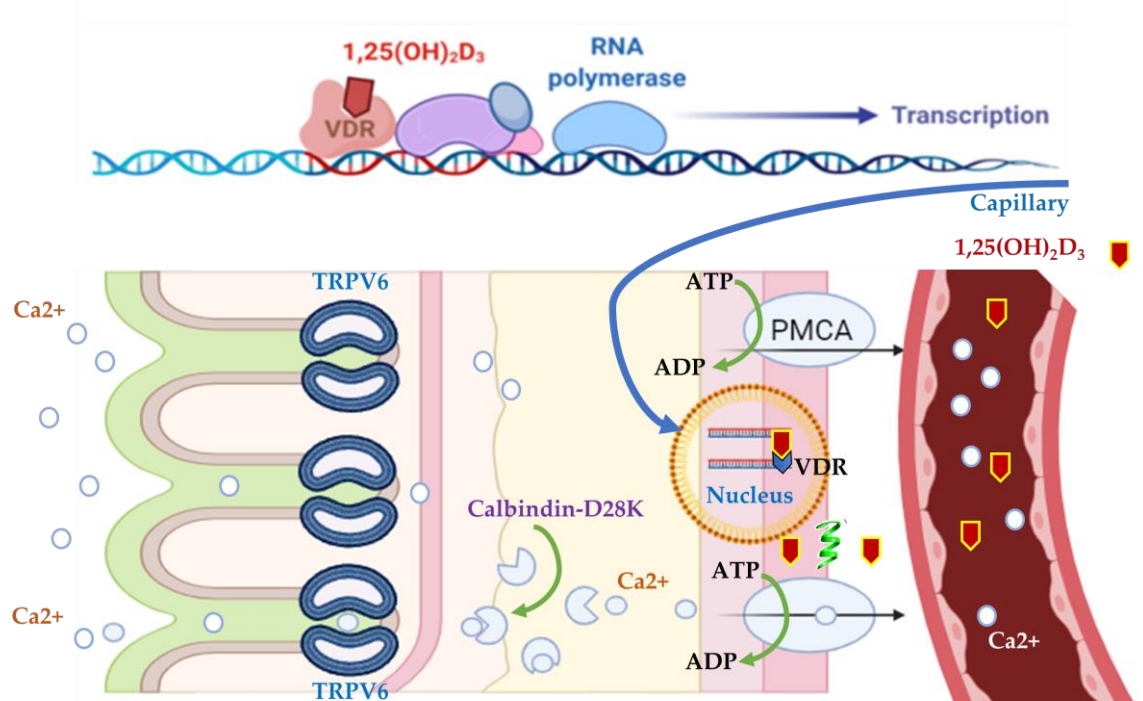


Figura 5. Canal seletivo de cálcio TRPV6 e Calbindin-D28K. TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid Channel Type 6); VDR (vitamin D receptor).

Estudo com imuno-histoquímica indicou positividade a anti-TRPV6 na borda apical das células do duodeno, jejuno, íleo, ceco e reto. Sendo a positividade mais alta no duodeno e mais fraca no reto, sendo ausente nas criptas e nas células caliciformes. PCR e Western blot também demonstraram a presença do TRPV6 nos segmentos supracitados, principalmente no duodeno e jejuno de poedeiras (Yang *et al.*, 2011). Esse achado é consistente, uma vez que os principais sítios de absorção de cálcio em aves é o duodeno e jejuno (Hurwitz *et al.*, 1967). Em humanos, TRPV6 (RNAm) também é mais abundante no duodeno e jejuno com poucos níveis no cólon ascendente, nada no íleo ou nos segmentos distais do intestino grosso (Peng *et al.*, 2000).

A presença significativa de TRPV6 (RNAm e proteína) no íleo de poedeiras (Yang *et al.*, 2011), contrasta com o encontrado em ratos, humanos e ovelhas (Peng *et al.*, 2000; Nijenhuis *et al.*, 2003; Wilkens *et al.*, 2009), sugerindo que o íleo também deve ter uma função significativa na absorção intestinal em poedeiras. No rim de poedeiras, o TRPV6 (proteína) é positivo na borda apical dos túbulos contorcidos proximais, alças de Henle e túbulos contorcidos distais, entretanto, mais fraca do que no sistema digestório.

Apesar do estudo citado (Yang *et al.*, 2011), para outros autores (Wasserman e Taylor, 1966; Qin *et al.*, 1993; Qin e Klandorf, 1993) a presença de TRPV6 em tecidos de aves, incluindo poedeiras ou codornas, ainda é incerta. Considerando que o TRPV6 seja expresso nos segmentos intestinais de poedeiras, a absorção de cálcio deve exercer significativa função na produção de ovos durante o pico da postura, incluindo a produção da casca, no útero. Tais observações vem de encontro com Yang *et al.* (2011), os quais descrevem áreas para futuros estudos abrangendo os mecanismos de transferência de cálcio em poedeiras. Tais estudos incluiriam o padrão de expressão de TRPV6 entre poedeiras e não poedeiras, a co-expressão com outras proteínas dependentes de vitamina, tal como calbindin-D28k, além da expressão em outros tecidos transportadores de cálcio como útero de aves e medula óssea.

Sendo assim, Yang *et al.* (2011) propõem que o canal epitelial TRPV6 possua função crucial na absorção e reabsorção de cálcio em poedeiras, porém, mais estudos são necessários para elucidar sua atuação, principalmente no útero e rim, sendo ainda, inexistentes estudos de tais transportadores de cálcio em codornas. Desta forma, o aumento da expressão e positividade ao TRPV6 pode comprovar

fisiologicamente o melhor aproveitamento de cálcio após modificações ambientais ou nutricionais.

A proteína Calbindin-D28K (Figura 5) desempenha um papel crucial no transporte de cálcio: uma vez no citoplasma, os íons cálcio se ligam com alta afinidade à calbindina D28K, que atua como transportadora facilitando a difusão do cálcio entre o citoplasma apical e basolateral das células (Moraes *et al.*, 2021).

A absorção passiva do cálcio envolve difusão de cálcio do lúmen intestinal para o enterócito, enquanto a absorção ativa é o processo na qual o cálcio passa por canais encontrados na membrana apical das microvilosidades dos enterócitos. Esses então se ligam a uma proteína que se liga ao cálcio, a Calbindin (vitamin D- induced calcium-binding protein), e o difunde pelo citoplasma, o qual é finalmente extrusado pelo CA_2^+ -ATPase na membrana basolateral, chegando ao sistema vascular através de vasos da lâmina própria (Sugiyama *et al.*, 2007).

Sendo assim, o potencial de absorção ativa de cálcio depende da presença de calbindin no citoplasma (Morrissey e Wasserman, 1971), sendo sua biossíntese dependente dos níveis circulatórios da vitamina D (Wu *et al.*, 1993), e da atividade da Ca_2^+ -ATPase na membrana basolateral (Cai *et al.*, 1993), sendo a maioria do cálcio dietético absorvido pelos segmentos intestinais pela via ativa (McCormick, 2002).

Calbindin existe em 2 formas principais, com baixo peso molecular, uma proteína de 9kDa (Calbindin-D9k) presente em intestinos de mamíferos, e outra com alto peso molecular com 28kDa (Calbindin-D28k), presente no rim, cérebro, intestino e útero de aves e rim de mamíferos (Fleet e Schoch, 2010).

A localização da calbindin-D28k em aves foi descrita inicialmente no intestino de frangos (Wasserman e Taylor, 1966) e depois no útero de poedeiras (Corradino *et al.*, 1968) e porção distal do istmo (Bar *et al.*, 1978), sendo as últimas localidades sítios da deposição de cálcio no oviduto de aves. A síntese de calbindin-D28k é dependente da vitamina D (Corradino *et al.*, 1968), entretanto, durante o ciclo de produção da casca do ovo, a concentração de Calbindin-D28k no útero é relativamente insensível a mudanças nos níveis plasmáticos da vitamina D (Bar *et al.*, 1978; Nys e Parkes, 1986).

No intestino de poedeiras, há positividade (proteína) de calbindin-D28k em todos os segmentos, sendo maior no duodeno e jejuno, principalmente nas porções apicais das vilosidades (Wu *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 2007), e menor em íleo. A positividade também ocorre no ceco e cólon, em menor intensidade, o que indica que

as poedeiras absorvem cálcio tanto no intestino delgado quanto no grosso (Sugiyama *et al.*, 2007). A expressão (RNAm) de calbindin-D28k intestinal em poedeiras é duas vezes maior em animais em postura (25 semanas) do que em aves ainda imaturas (11-17 semanas). Entretanto, tais aves imaturas não apresentam positividade (proteína) para anti-calbindin-D28k (Wu *et al.*, 1993). Apesar do modelo de atuação da calbindin-D28k demonstrado no estudo supracitado em poedeiras, ainda não se conhece como se comporta em outras espécies de postura como por exemplo codornas, cultura que vem crescendo na região Nordeste do Brasil (Pastore *et al.*, 2012).

O conhecimento de que existe um requerimento crescente de cálcio na dieta após a maturação sexual em poedeiras é estabelecido. Esse aumento é refletido na elevada expressão de calbindin-D28k nos enterócitos de poedeiras quando há produção de ovos (Wu *et al.*, 1993). A concentração de calbindin-D28k também estaria relacionada à quantidade de cálcio transportado para a casca do ovo no útero de poedeiras (Corradino *et al.*, 1993), tais níveis seriam induzidos pelo aumento do estrógeno. Sendo assim, a calbindin-D28k modularia a capacidade absorptiva intestinal de cálcio (Moraes *et al.*, 2021) e de deposição do mesmo no útero (Corradino *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 2024), influenciando na produção e na qualidade da casca do ovo.

É sabido que o estresse por altas temperaturas (30-33°C) diminui a presença de calbindin-D28k no íleo, ceco, colón, e útero de aves, causando deterioração da qualidade da casca do ovo sobre essa condição (Ebeid *et al.*, 2012). Tal fato pode ser explicado pelo estresse por calor reduzir a conversão da vitamina D3 em sua forma metabolicamente ativa, a 1,25 (OH)2D3, que é essencial para a absorção e a utilização de cálcio (Ribeiro *et al.*, 2024). De fato, a exigência de cálcio para poedeiras aumenta em condições de altas temperaturas ambientais (Moraes *et al.*, 2021). Desta forma, o aumento da expressão e positividade ao Calbindin-D28k também pode comprovar fisiologicamente o melhor aproveitamento de cálcio após determinado tratamento, seja ele através de dietas ou ambiental.

2.12 CONCLUSÕES

A incorporação de fitase nas dietas de codornas japonesas é uma estratégia promissora para otimizar a produção avícola. A capacidade da enzima fitase de liberar nutrientes essenciais é crucial para melhorar o desempenho e a produção de ovos,

permitindo que as codornas atinjam seu máximo potencial. Além disso, as fitases ajudam a reduzir os efeitos negativos do estresse térmico sobre as funções dos transportadores epiteliais de cálcio, preservando a integridade digestiva e reprodutiva das codornas poedeiras. Essa capacidade de reduzir os impactos do estresse térmico destaca ainda mais os benefícios das fitases na produção avícola, contribuindo para a sustentabilidade e qualidade da produção, além de promover o bem-estar das aves. Em resumo, a adição de fitase às dietas de codornas é uma abordagem eficaz e abrangente para aumentar a eficiência da produção. Recomenda-se o uso de uma concentração de 1500 FTUs de fitase, pois essa dosagem não só reduz os efeitos do estresse térmico, mas também melhora a espessura da casca dos ovos e a absorção de cálcio, contribuindo para maximizar o desempenho produtivo das codornas. Futuras pesquisas devem focar em explorar os efeitos sinérgicos da fitase em combinação com outras estratégias nutricionais e como essas abordagens podem melhorar ainda mais a tolerância ao estresse térmico nas codornas.

REFERÊNCIAS

- ABDULKADIR, A.; REDDY, D. A scoping review of the impact of heat stress on the organs of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). **The Journal of Basic and Applied Zoology**, 84, 8, 2023. <https://doi.org/10.1186/s41936-023-00331-z>.
- ADEDOKUN, S.A.; ADEOLA, O. Calcium and phosphorus digestibility: metabolic limits. **Journal of Applied Poultry Research**, 22, 600–608, 2013. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00740>.
- AGUDA, A.Y.; SEKONI, A.A.; OMAGE, J.J. Requirement of calcium and available phosphorus for laying Japanese quail birds (*Coturnix japonica*) in Nigeria. **Journal of Animal and Poultry Sciences**, 4, 31–38, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313387866_Requirement_of_Calcium_and_available_Phosphorus_for_Laying_Japanese_quail_birds_Coturnix_coturnix_japonica_in_Nigeria. Acessado em: 19 Jun. 2024.
- AKDEMIR, F.; KÖSEMAN, A.; ŞEKER, I. Alchemilla vulgaris effects on egg production and quality expressed by heat-stressed quail during the late laying period. **South African Journal of Animal Science**, 49, 1–12, 2019. <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i5.8>.
- AKDEMIR, F.; SAHIN, N.; ORHAN, C.; TUZCU, M.; SAHIN, K.; HAYIRLI, A. Chromium-histidinate ameliorates productivity in heat-stressed Japanese quails through reducing oxidative stress and inhibiting heat-shock protein expression. **British Poultry Science**, 56, 247–254, 2015. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1008992>.
- ALAGAWANY, M.; FARAG, M.R.; ABD EL-HACK, M.E.; PATRA, A. Heat stress: Effects on productive and reproductive performance of quail. **Worlds Poultry Science Journal**, 73, 747–756, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000782>.
- ALBINO, L.F.T.; BARRETO, S.L.T. Criação de Codornas para Produção de Ovos e Carne; Aprenda Fácil: Viçosa, Brazil, 2003. 268p.
- ALI, A.; TAN, H.Y.; KAIKO, G.E. Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction with the Microbiota in Food Allergy. **Frontiers in Immunology**, 11, 604054, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604054>.
- ALMEIDA, T.J.O.; ARAÚJO, V.V.; SILVA, A.V.; SILVA, R.F.; SANTOS, N.A.; SANTANA, M.D.; OLIVEIRA, V.P. Evolução Da Produção De Codornas Para Abate E Postura No Brasil. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão—JEPEX—UFRPE: Recife, **Anais** 2013. Disponível em: <https://portalidea.com.br/cursos/6409d8df3ed7101311dc5da38592c83c.pdf>. Acessado em: 15 Jun. 2024.
- ALVES, N.M.; GUIMARÃES, L.H.S.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, P.G. Production and Partial Characterization of an Extracellular Phytase Produced by *Muscodorus* sp. under Submerged Fermentation. **Advances in Microbiology**, 6, 23–32, 2016. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.61003>.

AMOAHA, J.K.; MARTIN, E.A.; BARROGA, A.J.; GARILLO, E.P.; DOMINGO, I. Calcium and phosphorus requirements of Japanese quail layers. **Journal of Applied Biosciences**, 54, 3892–3900, 2012. Disponível em: <https://m.elewa.org/JABS/2012/54/5.pdf>. Acessado em: 2 Jun. 2024.

ATTIA, Y.A.; HASSAN S.S. The effect of increasing dietary protein concentration with or without increasing energy levels on improving tolerance of broiler chickens to heat stress. **European Poultry Science**, 81. 2017. <https://www.european-poultry-science.com/Broiler-tolerance-to-heat-stress-at-various-dietary-proteinenergy-levels,QUIEPTUyOTYzNzQmTUIEPTE2MTAxNA.html>.

BANASZKIEWICZ, T. Nutritional Value of Soybean Meal. In Soybean and Nutrition; InTech Open: **London**, UK, 2011. <https://doi.org/10.5772/23306>.

BAR, A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: Mechanisms and regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 152, 447–469, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.020>.

BAR, A.; COHEN, A.; EISNER, U.; RISENFELD, G.; HURWITZ, S. Differential Response of Calcium Transport Systems in Laying Hens to Exogenous and Endogenous Changes in Vitamin D Status. **The Journal of Nutrition**, 108, 1322–1328, 1978. <https://doi.org/10.1093/jn/108.8.1322>.

BELKACEMI, L.; BÉDARD, I.; SIMONEAU, L.; LAFOND, J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: A review. **Cell Calcium**, 37, 1–8, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.06.010>.

BENESCH, R.; BARRON, N.S.; MAWSON, C.A. Carbonic anhydrase, sulphonamides and shell formation in the domestic fowl. **Nature**, 153, 138–139, 1944. <https://doi.org/10.1038/153138a0>.

BELLO, A.; DERSJANT-LI, Y.; KORVER, D.R. Effects of dietary calcium and available phosphorus levels and phytase supplementation on performance, bone mineral density, and serum biochemical bone markers in aged White egg-laying hens. **Poultry Science**, 99, 5792–5801. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.082>.

BERTECHINI, A.G. Metabolismo dos Minerais. In *Nutrição de Monogástricos*; BERTECHINI, A.G., Ed.; UFPA: Lavras, Brazil, 2012. pp. 207–255.

BHAVSAR, K.; KHIRE, J.M. Current research and future perspectives of phytase bioprocessing. **RSC Advances**, 4, 26677–26691, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4RA03445G>.

BIANCO, S.D.; PENG, J.B.; TAKANAGA, H.; KOS, C.H.; CRESCENZI, A.; BROWN, E.M.; HEDIGER, M.A. Mice lacking the epithelial calcium channel CaT1 (TRPV6) show a deficiency in intestinal calcium absorption despite high plasma levels of 1,25-dihydroxy vitamin D. **FASEB Journal**, 18, A706, 2004. Disponível

em: <https://eurekamag.com/research/035/305/035305455.php>. Acessado em 20 Ago. 2024.

BIANCO, S.D.C.; PENG, J.-B.; TAKANAGA, H.; SUZUKI, Y.; CRESCENZI, A.; KOS, C.H.; ZHUANG, L.; FREEMAN, M.R.; GOUVEIA, C.H.A.; WU, J. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. **Journal of Bone and Mineral Research**, 22, 274–285, 2007. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061110>.

BLOOT, A.P.M.; KALSCHNE, D.L.; AMARAL, J.A.S.; BARALDI, I.J.; CANAN, C. A Review of Phytic Acid Sources, Obtention, and Applications. **Food Reviews International**, 39, 73–92, 2021. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1906697>.

BORGES, G.C.S. **Peroxidação Lipídica, Desempenho e Características de Carcaça de Frangos de Corte Estressados Pelo Calor e Suplementados com Zinco e Selênio**. Dissertação de Mestrado, Escola de Medicina Veterinária, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, 2008. 61p. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12987>. Acessado em: 6 Jul. 2024.

BRANDÃO, P.A.; COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.V.; BRANDÃO, J.S.; NOBRE, J.G.S.; GOULART, C.C. Exigência de cálcio para codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em postura. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 29, 17–21, 2007. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3031/303126486001.pdf>. Acessado em: 2 Jun. 2024.

BRONNER, F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. **Journal of Cellular Biochemistry**, 88, 387–393, 2003. <https://doi.org/10.1002/jcb.10330>.

BROWN, A.J.; KRITS, I.; ARMBRECHT, H.J. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 437, 51–58, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.007>.

BÜNZEN, S.; ROSTAGNO, H.S.; LOPES, D.C.; HASHIMOTO, F.A.M.; PAULO CEZAR GOMES, P.C.; APOLÔNIO, L.R. Digestibilidade do fósforo de alimentos de origem vegetal determinada em suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37, 1236–1242, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000700014>.

BURLEY, R.W.; VADHERA, D.V. The Avian Egg. Chemistry and Biology; John Wiley & Sons Co.: **New York**, NY, USA, 1989. 472p.

CAI, Q.; CHANDLER, J.S.; WASSERMAN, R.H.; KUMAR, R.; PENNISTON, J.T. Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90, 1345–1349, 1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1345>.

Campos, E.J. Avicultura: Razões Fatos e Divergências; FEPMVZ: **Belo Horizonte**, Brazil, 2000. 311p.

CAMPOS, C.F.A.; RODRIGUÊS, K.F.; VAZ, R.G.M.V.; GIANNES, G.C.; SILVA, G.F.; PARENTE, I.P.; AMORIM, A.F.; BARBOSA, A.F.C.; SILVA, M.C.; FONSECA, F.L.R.; ARAÚJO, C.C.; SILVA, V.S.; SILVA, J.R.; SILVA, E.M.; CAMPOS, M.L.; MACHADO, S.B. Enzimas fúngicas em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento. **Revista Desafios**, 4, 2017. <http://dx.doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n2p35>.

CANAN, C.; CRUZ, F.T.L.; DELAROZA, F.; CASAGRANDE, R.; SARMENTO, C.P.M.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Studies on the Extraction and Purification of Phytic Acid from Rice Bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24, 1057–1063, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.12.014>.

CARVALHO, F.B.; STRINGHINI, J.H.; JARDIM FILHO, R.M.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; DEUS, H.A.S.B. Qualidade interna e de casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. **Ciência Animal Brasileira**, 8, 25–30, 2007. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/1155>. Acessado em: 4 Jul. 2024.

CARVALHO FILHO, D. U. **Sistema de climatização e suplementação dietética de fitase sobre a eficiência nutricional e produtiva de frangos de corte**. Tese (Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal, Linha de Pesquisa: Exigências Nutricionais e Avaliação de Alimentos para Ruminantes e Não Ruminantes), Universidade Federal do Piauí – UFP, Teresina, Piauí - Brasil, 2014.

CARVALHO, L.S.S.; FERNANDES, E.A. Formation and eggshell quality laying and breeding hens. **Medicina Veterinária Recife**, 7, 35–44, 2013. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/604>. Acessado em: 18 Mar. 2024.

CHANG, W.; TU, C.; CHEN, T.-H.; BIKLE, D.; SHOBACK, D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. **Science Signaling**, 1, 1–23, 2008. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1159945>.

CHAVES HERNÁNDEZ, A.J. Poultry and Avian Diseases. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014. pp. 504–520. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00183-2>.

CLEMENTE-SUÁREZ, V.J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A.; REDONDO-FLÓREZ, L.; VILLANUEVA-TOBALDO, C.V.; YÁÑEZ-SEPÚLVEDA, R.; TORNERO-AGUILERA, J.F. Epithelial Transport in Disease: An Overview of Pathophysiology and Treatment. **Cells**, 12, 2455, 2023. <https://doi.org/10.3390/cells12202455>.

CORRADINO, R.A.; SMITH, C.A.; KROOK, L.P.; FULLMER, C.S. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. **Endocrinology**, 132, 193–198, 1993. <https://doi.org/10.1210/endo.132.1.8419123>.

CORRADINO, R.A.; WASSERMAN, R.H.; PUBOLS, M.H.; CHANG, S.I. Vitamin D3 induction of a calcium-binding protein in the uterus of the laying hen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 125, 378–380, 1968. <https://doi.org/10.1016/0003-986190674-7>.

COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L.T.; UMIGI, R.T.; LIMA, H.J.D'A.; ARAUJO, M.S.; 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, 39, 1748–1755, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800017>.

COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L.T.; GOMES, P.C.; MAIA, G.V.C.; LIPARI, C.A.; HOSODA, L.H. Teores de cálcio em dietas para codornas japonesas no terço final de postura (45 a 57 semanas de idade). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62, 1225–1231, 2010b.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000500027>.

COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L.T.; MOURA, W.C.O.; REIS, R.S.; LEITE, C.D.S.; MAIA, G.V.C. Níveis de fósforo e cálcio em dietas para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira De Zootecnia**, 36, 2037–2046, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000900013>.

COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L.T.; UMIGI, R.T.; LIMA, H.J.D.A.; ARAUJO, M.S.; 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**, 39, 1748–1755, 2010a.

<https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800017>.

COSTELLO, A.J.R.; GLONEK, T.; MYERS, T.C. ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance-pH Titrations of Myo-Inositol Hexaphosphate. **Carbohydrate Research**, 46, 159–171, 1976.

<https://doi.org/10.1016/S0008-621584287-1>.

COWIESON, A.J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M.R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **Worlds Poultry Science Journal**, 67, 225–236, 2011.

<https://doi.org/10.1017/S0043933911000250>.

CROSS, H.S.; PETERLIK, M. Calcium and inorganic phosphate transport in embryonic chick intestine: Triiodothyronine enhances the genomic action of 1,25-dihydroxycholecalciferol. **The Journal of Nutrition**, 118, 1529–1534, 1988.

<https://doi.org/10.1093/jn/118.12.1529>.

CRUVINEL, J.M.; URAYAMA, P.M.G.; SANTOS, T.S.; DENADAI, J.C.; MURO, E.M.; DORNELAS, L.C.; PASQUALI, G.A.M.; CONTIN NETO, A.C.; ZANETTI, L.H.; FERREIRA NETTO, R.G. Different dietary electrolyte balance values on performance, egg, and bone quality of Japanese quail (*Coturnix japonica*) under heat stress. **Tropical Animal Health and Production**, 53, 17, 2020.

<https://doi.org/10.1007/s11250-020-02472-7>.

DAILIN, D.J.; HANAPI, S.Z.; ELSAYED, E.A.; SUKMAWATI, D.; AZELEE, N.I.W.; EYAHMALAY, J.; SIWAPIRAGAM, V.; EL ENSHASY, H. Fungal Phytases: Biotechnological Applications in Food and Feed Industries. In Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi; **Springer Nature**: Berlin, Germany, 2019. pp. 65–99.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_2.

DALLMANN, H.M.; AVILA, V.S.; KRABBE, E.L.; SUREK, D.; BEDENDO, G.C.; TOLEDO, T.S.; DALLMANN, P.R.; ROLL, A.A.P.; ROLL, V.F.B.; RUTZ, F. Different phytase levels and energy densities in broiler diets on performance,

nutrient digestibility, and bone integrity from 28 to 35 days of age. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 75, 280–292, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12790>.

DAVID, L.S.; ANWAR, M.N.; ABDOLLAHI, M.R.; BEDFORD, M.R.; RAVINDRAN, V. Calcium Nutrition of Broilers: Current Perspectives and Challenges. **Animals**, 13, 1590, 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13101590>.

DELMASCHIO, I.B. **Produção de Fitases por Fermentação em Estado Sólido e Imobilização das Enzimas por Spray Drying**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração em Microbiologia Industrial e Aplicada, Instituto de Biociências, Humanidades e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) 'Júlio de Mesquita Filho', Campus São José do Rio Preto, Brazil. 2014. 115p. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNSP_5ea0a9a9549bebefae1fbf3090e0ce6. Acessado em: 2 Abr. 2024.

DENG, W.; DONG, X.F.; TONG, J.M.; ZHANG, Q. The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poultry Science**, 91, 575–582, 2012. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01293>.

DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95, 878–896, 2014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>.

DIJKSLAG, M.A.; KWAKKEL, R.P.; MARTIN-CHAVES, E.; ALFONSO-CARRILLO, C.; WALVOORT, C.; VILA-NAVARRO, A. The effects of dietary calcium and phosphorus level, and feed form during rearing on growth performance, bone traits and egg production in brown egg-type pullets from 0 to 32 weeks of age. **Poultry Science**, 100, 6, 101130, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101130>.

EBEID, T.A.; SUZUKI, T.; SUGIYAMA, T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. **Poultry Science**, 91, 2282–2287, 2012. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01898>.

EUZÉBIO, T.C.; SANTOS, T.C. Importance of Research on the Nutritional Requirements of Vitamins and Minerals for Quail Farming. nutriNews 2021. Disponível em: <https://nutrinews.com/pt-br/importancia-das-pesquisas-sobre-as-exigencias-nutricionais-de-vitaminas-e-minerais-para-a-coturnicultura/>. Acessado em: 20 Jul. 2024.

FARAG, M.R.; ALAGAWANY, M. Physiological alterations of poultry to the high environmental temperature. **Journal of Thermal Biology**, 76, 101–106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.012>.

FARIAS, M.R.S.; LEITE, S.C.B.; SILVA, H.P.; PACHECO, D.B.; ALVES, G.C.; ABREU, C.G.; FREITAS, E.R. Superdosing Phytases in the Diets of Light Laying Hens: Productive Performance and Bone Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 23, 001–010, 2021. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1395>.

FARIAS, M.R.S.; LEITE, S.C.B.; VASCONCELOS, A.M.; SILVA, T.A.G.; LEITÃO, A.M.F.; SENA, T.L.; PACHECO, D.B.; ABREU, C.G.; SILVEIRA, R.M.F. Thermoregulatory, behavioral and productive responses of laying hens supplemented with different types and dosages of phytases raised in a hot environment: An integrative approach. **Journal of Thermal Biology**, 94, 102773, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102773>.

FERNANDES, J.I.M.; HORN, D.; RONCONI, E.J.; BUZIM, R.; LIMA, F.K.; PAZDIORA, D.A. Effects of Phytase Superdosing on Digestibility and Bone Integrity of Broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, 28, 390–398, 2019. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz001>.

FIGUEIRÊDO, A.V.; FIALHO, E.T.; VITTI, D.M.S.S.; LOPES, J.B.; SILVA FILHO, J.C.; TEIXEIRA, A.S.; LIMA, J.A.F. Ação da Fitase sobre a Disponibilidade Biológica do Fósforo, por Intermédio da Técnica de Diluição Isotópica, em Dietas com Farelo de Arroz Integral para Suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29, 177–182, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100024>.

FLEET, J.C.; SCHOCH, R.D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 47, 181–195, 2010. <https://doi.org/10.3109/10408363.2010.536429>.

FREELAND-GRAVES, J.H.; SANJEEVI, N.; LEE, J.J. Global perspectives on trace element requirements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 31, 135–141, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.04.006>.

FRIEDMAN, P.A.; GESEK, F.A. Cellular calcium transport in renal epithelia: Measurement, mechanisms, and regulation. **Physiological Reviews**, 75, 429–471, 1995. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.429>.

Frossard, E.; Bucher, M.; Mächler, F.; Mozafar, A.; Hurrell, R. Potential for Increasing the Content and Bioavailability of Fe, Zn and Ca in Plants for Human Nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 861–879. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-001080:7<861::AID-JSFA601>3.0.CO.;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-001080:7<861::AID-JSFA601>3.0.CO.;2-P).

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; MORAES, V.M.B.; MALHEIROS, R.D.; MALHEIROS, E.B.; SECATO, E.R. Alterações hematológicas e gasométricas em diferentes linhagens de frangos de corte submetidos ao estresse calórico agudo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 1, 77–84, 1999.

GARCÍA-ESTEPA, R.; GARCÍA-ESTEPA, R.M.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Phytic Acid Content in Milled Cereal Products and Breads. **Food Research International**, 32, 217–221, 1999. <https://doi.org/10.1016/S0963-996900092-7>.

GAUTIER, A.E.; WALK, C.L.; DILGER, R.N. Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol. **Poultry Science**, 97, 211–218, 2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pex291>.

GOBESSO, A.A.O.; WAJNSZTEJN, H.; RIBEIRO, R.M.; BASTOS, F.L.; ETCHICHURY, M.; ARAÚJO JÚNIOR, A.M.C. Comparison between different

sources of minerals in horses with nutritional secondary hyperparathyroidism. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 73, 73–81, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12107>.

GOUVEIA, A.B.V.S.; PAULO, L.M.; DIAS, A.G.F.; BATISTA, J.M.; BRASILEIRO, J.C.L.; MINAFRA, C.S.; STRINGHINI, J.H. Fitase na nutrição de aves de corte e postura: Revisão de literatura. **II Congresso Brasileiro de Produção Animal e Vegetal: Produção Animal e vegetal. Inovações e Atual**, 2, 984, 2022. <https://doi.org/10.53934/9786585062039-38>.

GREINER, R.; ALMINGER, M.L.; CARLSSON, N.G. Stereospecificity of *myo*-Inositol Hexakisphosphate Dephosphorylation by a Phytate-Degrading Enzyme of Baker's Yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 2228–2233, 2001. <https://doi.org/10.1021/jf0100090>.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytases: Biochemistry, Enzymology and Characteristics Relevant to Animal Feed Use. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*; BEDFORD, M.R., PARTRIDGE, G.G., EDS.; CAB International Publishing: Oxfordshire, UK, 2010. pp. 96–128. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/286044581_Phytases_Biochemistry_Enzymology_and_Characteristics_Relevant_to_Animal_Feed_Use. Acessado em: 20 Ago. 2024.

HEZAVEH, M.S.S.; GHASEMI, H.A.; HAJKHODADADI, I.; MORADI, M.H. Single and combined effects of phytase and citric acid on growth performance, nutrient digestibility, bone characteristics, intestinal morphology, and blood components in meat-type quails fed low-phosphorous diets. **Animal Feed Science and Technology**, 269, 114677, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2020.114677>.

HIRNET, D.; OLAUSSON, J.; FECHER-TROST, C.; BÖDDING, M.; NASTAINCZYK, W.; WISSENBAACH, U.; FLOCKERZI, V.; FREICHEL, M. The TRPV6 gene, cDNA and protein. **Cell Calcium**, 33, 509–518, 2003. <https://doi.org/10.1016/S0143-416000066-6>.

HIRVONEN, J.; LILJAVIRTA, J.; SAARINEN, M.T.; LEHTINEN, M.J.; AHONEN, I.; NURMINEN, P.I. Effect of Phytase on in Vitro Hydrolysis of Phytate and the Formation of *myo*-Inositol Phosphate Esters in Various Feed Materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, 11396–11402, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03919>.

HOENDEROP, J.G.J.; NILIUS, B.; BINDELS, R.J.M. Calcium Absorption Across Epithelia. **Physiological Reviews**, 85, 373–422, 2005. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2004>.

HOLM, L.; BLOMQVIST, A.; BRANDT, I.; BRUNSTRÖM, B.; RIDDERSTRÅLE, Y.; BERG, C. Embryonic exposure to o, p'-DDT causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 25, 2787–2793, 2006. <https://doi.org/10.1897/05-619r.1>.

HU, P.; LI, K.; PENG, X.; YAO, T.; ZHU, C.; GU, H.; LIU, H.-Y.; SUN, M.; HU, Y.; ENNAB, W. Zinc intake ameliorates intestinal morphology and oxidative stress of

broiler chickens under heat stress. **Frontiers in Immunology**, 14, 1308907, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1308907>.

HU, Y.X.; VAN HARN, J.; HENDRIKS, W.H.; VAN BAAL, J.; DIJKSLAG, M.A.; VAN KRIMPEN, M.M.; BIKKER, P. Low-calcium diets increase duodenal mRNA expression of calcium and phosphorus transporters and claudins but compromise growth performance irrespective of microbial phytase inclusion in broilers. **Poultry Science**, 100, 101488, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101488>.

HURWITZ, S.; HARRISON, H.C.; HARRISON, H.E. Effect of vitamin D3 on the in vitro transport of calcium by the chick intestine. **The Journal of Nutrition**, 91, 319–323, 1967. https://doi.org/10.1093/jn/91.3_Suppl.319.

HWANG, C.-S.; SHEMORRY, A.; VARSHAVSKY, A. Two proteolytic pathways regulate DNA repair by cotargeting the Mgt1 alkylguanine transferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, 2142–2147, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812316106>

IFP—Inorganic Feed Phosphates. Phosphorus: A Vital Source of Animal Nutrition. 2024. Disponível em: <https://www.feedphosphates.org/index.php/guides/11-guides/11-phosphorus-a-vital-source-of-animal-nutrition>. Acessado em: 2 Ago. 2024.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA). Alimentação dos Animais Monogástricos: Suínos, Coelhos e Aves, 2nd ed.; **Roca: São Paulo: Brazil**, 1999. 245p.

JATUWONG, K.; SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; PENKHRUE, W.; KAKUMYAN, P.; LUMYONG, S. Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. **Frontiers in Microbiology**, 11, 188, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00188>.

KASIM, B.; EDWARDS, H.M. The Analysis of Inositol Phosphate Forms in Feed Ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76, 1–9, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-001076:1<1::AID-JSFA922>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-001076:1<1::AID-JSFA922>3.0.CO;2-9).

KAZIM, S.; OMER, K. Zinc Supplementation Alleviates Heat Stress in Laying Japanese Quail. **The Journal of Nutrition**, 133, 2808–2811, 2003. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2808>.

KIM, D.H.; KIM, Y.B.; LEE, S.H.; LEE, Y.K.; LEE, S.D.; LEE, K.W. Identical thermal stress coupled with different temperature and humidity combinations affects nutrient digestibility and gut metabolites of laying hens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 52, e20220067, 2023. <https://doi.org/10.37496/rbz5220220067>.

KIM, D.H.; LEE, Y.K.; LEE, S.D.; KIM, S.H.; LEE, S.R.; LEE, H.G.; LEE, K.W. Changes in Production Parameters, Egg Qualities, Fecal Volatile Fatty Acids, Nutrient Digestibility, and Plasma Parameters in Laying Hens Exposed to Ambient Temperature. **Frontiers in Veterinary Science**, 7, 412, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00412>.

KIM, H.J.; LEE, G.S.; JI, Y.K.; CHOI, K.C.; JEUNG, E.B. Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 291, E234–E241, 2006.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00434.2005>.

KIM, J.H.; PITARGUE, F.M.; JUNG, H.; HAN, G.P.; CHOI, H.S.; KIL, D.Y. Effect of superdosing phytase on productive performance and egg quality in laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 30, 994–998, 2017.
<https://doi.org/10.5713/ajas.17.0149>.

KRISELDI, R.; WALK, C.L.; BEDFORD, M.R.; DOZIER, W.A. Inositol and gradient phytase supplementation in broiler diets during a 6-week production period: 2. Effects on phytate degradation and inositol liberation in gizzard and ileal digesta contents. **Poultry Science**, 100, 100899, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.068>.

KUMAR, S.; ANAND, R. Effect of Germination and Temperature on Phytic Acid Content of Cereals. **International Journal of Research in Agricultural Sciences**, 8, 1–13, 2021. Disponível em:
https://ijras.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJRAS_932_FINAL.pdf. Acessado em: 2 Ago. 2024.

LAMBERS, T.T.; BINDELS, R.J.M.; HOENDEROP, J.G.J. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. **Kidney International**, 69, 650–654, 2006.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000169>.

LAUTROU, M.; POMAR, C.; DOURMAD, J.-Y.; NARCY, A.; SCHMIDELY, P.; LÉTOURNEAU-MONTMINY, M.P. Phosphorus and calcium requirements for bone mineralisation of growing pigs predicted by mechanistic modelling. **Animal**, 14, s313–s322, 2020. <https://doi.org/10.1017/S1751731120001627>.

LEE, G.S.; JEUNG, E.B. Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 293, 132–139, 2007.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00666.2006>.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Commercial Poultry Nutrition**. 3rd Edition. Third Edition, University Books P.O. Box 1326 Guelph, Ontario, 2008.

LEHRFELD, J. High-performance Liquid Chromatography Analysis of Phytic Acid on a pH-stable, Macroporous Polymer Column. **Cereal Chemistry**, 66, 510–515, 1989. Disponível em:
https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1989/Documents/66_510.pdf. Acessado em: 3 Ago. 2024.

LELIS, G.R.; ALBINO, L.F.T.; SILVA, C.R.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.G.; BORSATTO, CG. Suplementação dietética de fitase sobre o metabolismo de nutrientes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 1768–1773, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800020>.

LESSON, S.; SUMMERS, J.D. **Commercial Poultry Nutrition**; Nottingham University Press: **Nottingham**, UK, 1991. 283p.

LEYVA-JIMENEZ, H.; ALSADWI, A.M.; GARDNER, K.; VOLTURA, E.; BAILEY, C.A. Evaluation of high dietary phytase supplementation on performance, bone mineralization, and apparent ileal digestible energy of growing broilers. **Poultry Science**, 98, 811–819, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pey389>.

LIMA, H.J.D.A.; BARRETO, S.L.T.; DONZELE, J.L.; VALERIANO, M.H.; VIEIRA, P.A.F.; COSTA, C.H.R. Dietary phytase levels on performance and egg quality of Japanese quails. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 129–134, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000100018>.

LINSLEY, J.G.; BURGER, R.E. Respiratory and cardiovascular responses in the hyperthermic domestic cock. **Poultry Science**, 43, 291–305, 1964. <https://doi.org/10.3382/ps.0430291>.

LOLAS, G.; PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. Phytic Acid Total Phosphorus Relationship Relationship in Barley, Oats, Soybeans and Wheat. **Cereal Chemistry**, 53, 867–871, 1976. Disponível em: https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1976/Documents/chem53_867.pdf. Acessado em: 3 Ago. 2024.

LUKANOV, H. Domestic quail (*Coturnix japonica domestica*), is there such farm animal? **Worlds Poultry Science Journal**, 75, 547–558, 2019. <https://doi.org/10.1017/S0043933919000631>.

LUKANOV, H.; PAVLOVA, I. Domestication changes in Japanese quail (*Coturnix japonica*): A review. **Worlds Poultry Science Journal**, 76, 787–801, 2020. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1823303>.

MANOBHAVAN, M.; ELANGO VAN, A.V.; SRIDHAR, M.; SHET, D.; AJITH, S.; PAL, D.T.; GOWDA, N.K.S. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn-soya-based diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 100, 93–100, 2016. <https://doi.org/10.1111/jpn.12341>.

MARTÍNEZ-VALLESPÍN, B.; MÄNNER, K.; ADER, P.; ZENTEK, J. Evaluation of high doses of phytase in a low-phosphorus diet in comparison to a phytate-free diet on performance, apparent ileal digestibility of nutrients, bone mineralization, intestinal morphology, and immune traits in 21-day-old broiler chickens. **Animals**, 12, 1955, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12151955>.

MASHALY, M.M.; HENDRICKS, G.L.; KALAMA, M.A.; GEHAD, A.E.; ABBAS, A.O.; PATTERSON, P.H. Effect of Heat Stress on Production Parameters and Immune Responses of Commercial Laying Hens. **Poultry Science**, 83, 889–894, 2004. <https://doi.org/10.1093/ps/83.6.889>.

MASUKAWA, Y.; FERNANDES, E.; MORAES, V.; ARIKI, J.; BRUNO, L. Níveis de cálcio da dieta sobre o desempenho e a qualidade da casca de ovos de codornas japonesas. **Ars Veterinária**, 17, 144–148, 2001.

MATOS JÚNIOR, J.J.L.; FURTADO, D.A.; RIBEIRO, N.L.; MARQUES, J.I.; LEITE, P.G.; NASCIMENTO, J.W.B.; RODRIGUES, V.P.; LOPES NETO, J.P.; RODRIGUES, L.R.; SANTOS, S.G.C.G. Productive performance, egg quality and

the morphometry of the organs of Japanese quails (*Coturnix japonica*) kept at different temperatures. **Food Science and Technology**, 43, 117822, 2023. <https://doi.org/10.1590/fst.117822>.

MAYNARD, C.J.; MAYNARD, C.W.; MULLENIX, G.J.; RAMSER, A.; GREENE, E.S.; BEDFORD, M.R.; DRIDI, S. Impact of Phytase Supplementation on Meat Quality of Heat-Stressed Broilers. **Animals**, 13, 2043, 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13122043>.

MAZZUCO, H. Osteoporose em Poedeiras Comerciais: Uma Doença Metabólica Multifatorial. Circular Técnica, n. 43, Concórdia: **Embrapa Aves e Suínos**, 2005. pp. 1–8. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/57891/1/CUsersPiazzonDocumentsCIT-43.pdf>. Acessado: 4 Ago. 2024.

MCCORMICK, C.C. Passive diffusion does not play a major role in the absorption of dietary calcium in normal adults. **The Journal of Nutrition**, 132, 3428–3430, 2002. <https://doi.org/10.1093/jn/132.11.3428>.

MCDOWELL, L.R. Calcium and Phosphorus. In *Minerals in Animal and Human Nutrition*, 2nd ed.; Elsevier Science BV: Amsterdam, **The Netherlands**, 2003. 144p.

MEHAISEN, G.M.K.; DESOKY, A.A.; SAKR, O.G.; SALLAM, W.; ABASS, A.O. Propolis alleviates the negative effects of heat stress on egg production, egg quality, physiological and immunological aspects of laying Japanese quail. **PLoS ONE**, 14, e0214839, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214839>.

MEHAISEN, G.M.K.; IBRAHIM, R.M.; DESOKY, A.A.; SAFAA, H.M.; EL-SAYED, O.A.; ABASS, A.O. The importance of propolis in alleviating the negative physiological effects of heat stress in quail chicks. **PLoS ONE**, 12, 1–17, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186907>.

MELLO, J.F. Influência dos Níveis de Cálcio e Fósforo na Dieta de Matrizes de Codornas Japonesas, no Desempenho Produtivo e no Desenvolvimento Ósseo Embrionário da Progenie. Dissertação de Mestrado, Graduate Program in Animal Science, State University of Maringá, Paraná, Brazil, 2015. 82p. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/1764/1/000220522.pdf>. Acessado em: 25 Jul. 2024.

MELO, A.S.; FERNANDES, R.T.V.; MARINHO, J.B.M.; ARRUDA, A.M.V.; FIGUEIRÊDO, L.C.; FERNANDES, R.T.V. Relação temperatura e nutrição sobre o desempenho de galinhas poedeiras. **PUBVET**, 10, 855–860, 2016. <https://doi.org/10.22256/10.22256/pubvet.v10n11.855-860>.

MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN, J.P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. **Metabolism**, 51, 5–10, 2002. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.33184>.

MIRANDA, C.C. **Formas Inorgânicas e Orgânicas de Minerais e Temperatura Ambiente Sobre o Desempenho, Imunidade e Parâmetros Sanguíneos em Frangos de Corte**. Dissertação de Mestrado, Graduate Program in Animal Science at São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, Botucatu, SP, Brazil, 2010. 59p. Disponível em: <https://www.fmvz.unesp.br/Home/ensino/pos->

graduacao768/zootecnia/dissertacoeseteses/carolina-carvalho-de-miranda.pdf. Acessado em: 2 Ago. 2024.

MOE, S.M. Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, 35, 215–237, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2008.01.007>.

MOHEBBIFAR, A.; TORKI, M.; GHASEMI, H.A. Effect of phytase supplementation of diets with different levels of rice bran and non-phytate phosphorus on productive performance, egg quality traits, leukocytes profile and serum lipids of laying hens reared indoor under high environmental temperatures. **Animal Feed Science and Technology**, 207, 222–233, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.06.024>.

MONGIN, P. Role of acid-base balance in the physiology of egg-shell formation. **Worlds Poultry Science Journal**, 24, 200–230, 1968. <https://doi.org/10.1079/WPS19680021>.

Moraes, L.R.; Delicato, M.E.A.; Cruz, A.S.; Silva, H.T.F.N.P.; Alves, C.V.B.V.; Campos, D.B.; Saraiva, E.P.; Costa, F.G.P.; Guerra, R.R. Methionine supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. **PLoS ONE**, 16, e0245615, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245615>.

MORRISSEY, R.; WASSERMAN, R. Calcium absorption and calcium-binding protein in chicks on differing calcium and phosphorus intakes. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, 220, 1509–1515, 1971. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.5.1509>.

MOTA, A.S.B.; LIMA, P.M.S.; SILVA, D.S.; ABREU, V.K.G.; FREITAS, E.R.; PEREIRA, A.L.F. Internal quality of eggs coated with cassava and yam starches. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 12, 47–50, 2017. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i1a5420>.

NAOT, D.; MUSSON, D.S.; CORNISH, J. The Activity of Peptides of the Calcitonin Family in Bone. **Physiological Reviews**, 99, 781–805, 2019. <https://doi.org/10.1152/physrev.00066.2017>.

NASAR, A.; RAHMAN, A.; HOQUE, N.; KUMAR TALUKDER, A.; DAS, Z.C. A survey of Japanese quail (*Coturnix japonica*) farming in selected areas of Bangladesh. **Veterinary World**, 9, 940–947, 2016. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.940-947>.

NASCIMENTO, M.Q. Níveis de Cálcio e de Fósforo em Dietas para Codornas Japonesas Utilizando Fosfato Bicálcico com Duas Granulometrias. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil. 2013. 84p. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/server/api/core/bitstreams/52bfca24-9ea6-4806-87f3-a81e761c8309/content>. Acessado em: 2 Jun. 2024.

NASCIMENTO, M.Q.; VARGAS JUNIOR, J.G.; PINTO, C.E.L.; DEMUNER, L.F.; PETRUCCI, F.B.; VIEITES, F.M. Optimal Available Phosphorus Levels in Diets Containing Different Dicalcium Phosphate Particle Sizes for Japanese Quails.

Brazilian Journal Poultry Science, 21, 001–008, 2019.

<https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0878>.

NATIONAL ACADEMICS PRESS (NRC). *Nutrient Requirements of Poultry*, 9th ed.; National Academics Press: **Washington**, DC, 1994. Disponível em:

[https://books.google.com.br/books?hl=pt-](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=bbV1FUqRcM0C&oi=fnd&pg=PT13&dq=NRC+1994+Nutrient+Requirements+of+Poultry.+9th+ed.+National+Academics+Press,+Washington&ots=IleM4AkqTs&sig=2LI0iW3NGbzHsQc19UoHD17wtXM#v=onepage&q&f=false)

[BR&lr=&id=bbV1FUqRcM0C&oi=fnd&pg=PT13&dq=NRC+1994+Nutrient+Requirements+of+Poultry.+9th+ed.+National+Academics+Press,+Washington&ots=IleM4AkqTs&sig=2LI0iW3NGbzHsQc19UoHD17wtXM#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=bbV1FUqRcM0C&oi=fnd&pg=PT13&dq=NRC+1994+Nutrient+Requirements+of+Poultry.+9th+ed.+National+Academics+Press,+Washington&ots=IleM4AkqTs&sig=2LI0iW3NGbzHsQc19UoHD17wtXM#v=onepage&q&f=false).

Acessado em: 5 Jul. 2024.

NAVES, L.P.; CORRÊA, A.D.; BERTECHINI, A.G.; GOMIDE, E.M.; SANTOS, C.D. Effect of pH and Temperature on the Activity of Phytase Products Used in Broiler Nutrition. **Brazilian Journal Poultry Science**, 14, 159–232, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S1516-635X2012000300004>.

NAWAB, A.; IBTISHAM, F.; LI, G.; KIESER, B.; WU, J.; LIU, W.; ZHAO, Y.

NAWAB, Y.; LI, K.; XIAO, M.; AN, L. Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry.

Journal of Thermal Biology, 78, 131–139, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010>.

NELSON, T.S.; SHIEH, T.R.; WODZINSKI, R.J.; WARE, J.H. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. **The Journal of Nutrition**, 101, 1289–1294, 1971.

<https://doi.org/10.1093/jn/101.10.1289>.

NEZHAD, N.G.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; NORMI, Y.M.; OSLAN, S.N.; SHARI, F.M.; LEOW, T.C. Integrative Structural and Computational Biology of Phytases for the Animal Feed Industry. **Catalysts**, 10, 844, 2020.

<https://doi.org/10.3390/catal10080844>.

NIJENHUIS, T.; HOENDEROP, J.G.J.; VAN DER KEMP, A.W.C.M.; BINDELS, R.J.M. Localization and Regulation of the Epithelial Ca²⁺ Channel TRPV6 in the Kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, 14, 2731–2740, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000094081.78893.e8>.

NIU, Z.Y.; LIU, F.Z.; YAN, Q.L.; LI, W.C. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress.

Poultry Science, 88, 2101–2107, 2009. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00220>.

NYS, Y.; HINCKE, M.; ARIAS, J.; GARCIA-RUIZ, J.; SOLOMON, S. Avian eggshell mineralization. **Avian and Poultry Biology Reviews**, 10, 143–166, 1999. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Yves-](https://www.researchgate.net/profile/Yves-Nys/publication/279562431_Avian_Eggshell_Mineralization/links/5630e38208ae0530378cf614/Avian-Eggshell-Mineralization.pdf)

[Nys/publication/279562431_Avian_Eggshell_Mineralization/links/5630e38208ae0530378cf614/Avian-Eggshell-Mineralization.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Yves-Nys/publication/279562431_Avian_Eggshell_Mineralization/links/5630e38208ae0530378cf614/Avian-Eggshell-Mineralization.pdf). Acessado em: 21 Jul. 2024.

NYS, Y.; PARKES, C.O.; THOMASSET, M. Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity, and intestinal calcium absorption in hens. **General and Comparative Endocrinology**, 64, 293–299, 1986.

<https://doi.org/10.1016/0016-648090016-x>.

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W.P.; MUNIZ, J.C.L. Panorama Da Coturnicultura No Brasil. **Revista eletrônica – Nutritime**, 9, 2041–2049, 2012. Disponível em: <https://portalidea.com.br/cursos/25e421f08de4aab6d494d4a76b957d11.pdf>. Acesado em: 2 Mar. 2024.

PATRA, T.; PATI, P.K.; MOHAPATRA, A.K. Study on carcass quality of coloured broiler chicks supplemented with vitamin E and C during summer stress. **SAARC Journal of Agriculture**, 9, 123–132, 2011. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123050083>. Acessado em: 2 Jan. 2024.

PAYNE, R.L.; LAVERGNE, T.K.; SOUTHERN, L.L. A comparison of two sources of phytase in liquid and dry forms in broilers. **Poultry Science**, 84, 265–272, 2005. <https://doi.org/10.1093/ps/84.2.265>.

PEDROSO, A.A.; MORAES, V.M.B.; ARIKI, J.; KRONKA, S.N. Níveis de cálcio e fósforo na ração sobre o desempenho e qualidade dos ovos de codornas japonesas. **Ars Veterinaria**, 15, 135 –139, 1999.

PELICIA, K.; GARCIA, E.A.; FAITARONE, A.B.G.; SILVA, A.P.; BERTO, D.A.; MOLINO, A.B.; VERCESE, F. Calcium and Available Phosphorus Levels for Laying Hens in Second Production Cycle. **Brazilian Journal Poultry Science**, 11, 39–49, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbca/a/VgmDHbKHdXPv4vKMXvb9qhk/?format=pdf&lang=en>. Acessado em: 19 Jul. 2024.

PENG, J.B.; CHEN, X.Z.; BERGER, U.V.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C.C.; VASSILEV, P.M.; BROWN, E.M.; HEDIGER, M.A. Human calcium transport protein cat1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 278, 326–332, 2000. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3716>.

PENG, J.B.; SUZUKI, Y.; GYIMESI, G.; HEDIGER, M.A. TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels. In Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells; Kozak, J.A., Putney, J.W., Jr., Eds.; CRC Press/**Taylor & Francis**: Boca Raton, FL, USA, 2018. Chapter 13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531440/>. Acessado em: 20 Ago. 2024.

PINHEIRO, S.R.F. Níveis De Fósforo, De Cálcio E De Cloreto De Sódio Para Aves De Linhagens De Crescimento Lento Criadas Em Sistema Semi-Confinado. Tese (Doutor em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista—UNESP, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/d5d73a2d-e13f-472a-8597-0e30913775cb/content>. Acessado em: 20 Abr. 2024.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; VARGAS JÚNIOR, J.G. Protein and Energy Levels for Laying Japanese Quails. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31, 1761–1770, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000700019>.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M.R.; ACAMOVIC, T.; ALLYMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. **British Poultry Science**, 52, 245–254, 2011. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.560596>.

PRASAD, A.S.; KUCUK, O. Zinc in cancer prevention. **Cancer and Metastasis Reviews**, 21, 291–295, 2002. <https://doi.org/10.1023/a:1021215111729>.

QIN, X.; KLANDORF, H. Effect of Estrogen in Relation to Dietary Vitamin D3 and Calcium on Activity of Intestinal Alkaline Phosphatase and Ca-ATPase in Immature Chicks. **General and Comparative Endocrinology**, 90, 318–327, 1993. <https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1087>.

QIN, X.; KLANDORF, H.; PORTER, D.W.; HOLT, S.B.; MARTIN, W.G. Estrogen Enhancement of Ca-, Mg-, and Ca-Mg-Stimulated Adenosine Triphosphatase Activity in the Chick Shell Gland. **General and Comparative Endocrinology**, 89, 4–10, 1993. <https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1003>.

RAVINDRAN, S.; RAVINDRAN, V.; SIVALOGAN, G. Total and Phytate Phosphorus Contents of Various Foods and Feedstuffs of Plant Origin. **Food Chemistry**, 50, 133–136, 1994. <https://doi.org/10.1016/0308-814690109-0>.

REZAEIPOUR, V.; BARSALANI, A.; ABDULLAHPOUR, R. Effects of phytase supplementation on growth performance, jejunum morphology, liver health, and serum metabolites of Japanese quails fed sesame (*Sesamum indicum*) meal-based diets containing graded levels of protein. **Tropical Animal Health and Production**, 48, 1141–1146, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1066-x>.

RIBEIRO, A.G.; SILVA, R.S.; COSTA, F.S.; SILVA, E.G.; SANTOS RIBEIRO, J.E.; SARAIVA, E.P.; COSTA, F.G.P.; GUERRA, R.R. Phytase super-dosing modulates bone parameters and the concentration of the calcium epithelial carrier Calbindin-D28k in quails (*Coturnix japonica*) under thermal stress. **Animal Production Science**, 64, AN24057, 2024. <https://doi.org/10.1071/AN24057>.

RIBEIRO, C.L.N.; BARRETO, S.L.T.; REIS, R.S.; MUNIZ, J.C.L.; VIANA, G.S.; RIBEIRO JUNIOR, V.; MENDONÇA, M.O.; FERREIRA, R.C.; DEGROOT, A.A. The Effect of Calcium and Available Phosphorus Levels on Performance, Egg Quality and Bone Characteristics of Japanese Quails at End of the Egg-Production Phase. **Brazilian Journal Poultry Science**, 18, 033–040, 2016. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0014>.

ROJAS, I.Y.M.; GONZÁLEZ, E.A.; MENOCAL, J.A.; SANTOS, T.T.; ARGUELLO, J.R.; COELLO, C.L. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum-soybean-meal-based diets. **Journal of Applied Animal Research**, 46, 314–321, 2017. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1299740>.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; CALDERANO, A.A.; HANNAS, M.I.; DONZELE, J.L.; SAKOMURA, N.K.; PERAZZO, F.G.; BRITO, C.O. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos, 5th ed.; **Universidade Federal de Viçosa**: Viçosa, Brazil, 2024; 576p.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; HANNAS, M.I.; DONZELE, J.L.; SAKOMURA, N.K.; PERAZZO, F.G.; BRITO, C.O. Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements, 4th ed. In Proceedings of the IV International Symposium on Nutritional Requirements of Poultry and Swine, **Viçosa**, Brazil, 30 March 2017; 488p.

RUTTKAY-NEDECKY, B.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, 6044–6066, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>.

RUZAL, M.; SHINDER, D.; MALKA, I.; YAHAV, S. Ventilation plays an important role in hens' egg production at high ambient temperature. **Poultry Science**, 90, 856–862, 2011. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00993>.

SAEED, M.; ABBAS, G.; ALAGAWANY, M.; ALI KAMBOH, A.; ABD EL-HACK, M.E.; KHAFAGA, A.F.; CHAO, S. Heat stress management in poultry farms: A comprehensive overview. **Journal of Thermal Biology**, 84, 414–425, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.025>.

SAHIN, K.; SAHIN, N.; KUCUK, O.; HAYIRLI, A.; PRASAD, A.S. Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: A review. **Poultry Science**, 88, 2176–2183, 2009. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00560>.

SAHIN, K.; SAHIN, N.; ONDERCI, M. Vitamin E supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, egg quality, digestibility of nutrients and egg yolk mineral concentrations of Japanese quails. **Research in Veterinary Science**, 73, 307–312, 2002. <https://doi.org/10.1016/S0034-528800126-1>.

SAHIN, N.; ORHAN, C.; TUZCU, M.; SAHIN, K.; KUCUK, O. The Effects of Tomato Powder Supplementation on Performance and Lipid Peroxidation in Quail. **Poultry Science**, 87, 276–283, 2008. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00207>.

SANDIKCI, M.; EREN, U.; ONOL, A.G.; KUM, S. The effect of heat stress and the use of *Saccharomyces cerevisiae* or (and) bacitracin zinc against heat stress on the intestinal mucosa in quails. **Journal of Veterinary Medicine**, 11, 552–556, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/289759420_The_effect_of_heat_stress_and_the_use_of_Saccharomyces_cerevisiae_or_and_bacitracin_zinc_against_heat_stress_on_the_intestinal_mucosa_in_quails. Acessado em: 2 Abr. 2024.

SANTOS, K.O.; COSTA-FILHO, J.; RIET, J.; SPAGNOL, K.L.; NORNBERG, B.F.; KÜTTER, M.T.; TESSER, M.B.; MARINS, L.F. Probiotic expressing heterologous phytase improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. **Fish Shellfish Immunology**, 93, 652–658, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.030>.

SANTOS, T.C.; GATES, R.S.; TINÔCO, I.F.F.; ZOLNIER, S.; BAÊTA, F.C. Behavior of Japanese quail in different air velocities and air temperatures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 52, 344–354, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000500008>.

SARCINELLI, M.F.; VENTURINI, K.S.; SILVA, L.C. **Características dos Ovos**. In Boletim Técnico, Universidade Federal do Espírito Santo; Universidade Federal do Espírito Santo: Vitória, Brazil, 2007. Disponível em:

https://www.agais.com/telomc/b00707_caracteristicas_ovos.pdf. Acessado em: 3 Jun. 2024.

SATO, V.S.; JORGE, J.A.; OLIVEIRA, W.P.; SOUZA, C.R.F.; GUIMARÃES, L.H.S. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 177–87, 2014. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08087>.

SCHOULTEN, N.A.; TEIXEIRA, A.S.; FREITAS, R.T.F.; BERTECHINI, A.G.; CONTE, A.J.; SILVA, H.O. Níveis de Cálcio em Rações de Frangos de Corte na Fase Inicial Suplementadas com Fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32, 1190–1197, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/3YD6bYvWGrv8n6mW5YpyQxM/?format=pdf&lang=pt>. Acessado em: 4 Abr. 2024.

SENA, T.L.; LEITE, S.C.B.; FARIAS, M.R.S.; ABREU, C.G.; FREITAS, E.R.; COSTA, A.C. Phytase Superdosing in the Diet of Lightweight Replacement Pullets: Performance, Organ Biometry and Bone Characteristics. **Brazilian Journal Poultry Science**, 22, 001-008, 2020b. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1276>.

SENA, T.L.; LEITE, S.C.B.; VASCONCELOS, A.M.; BEZERRA, M.M.R.; ABREU, C.G.; FARIAS, M.R.S.; SILVEIRA, R.M.F. Does dietary supplementation with phytases affect the thermoregulatory and behavioral responses of pullets in a tropical environment? **Journal of Thermal Biology**, 88, 102499, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102499>.

SERNA, J.; BERGWITZ, C. Importance of Dietary Phosphorus for Bone Metabolism and Healthy Aging. **Nutrients**, 12, 3001, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12103001>.

SILVA, A.P. Níveis de Cálcio e Fósforo na Dieta de Codornas Japonesas (*Coturnix japonica*) em Diferentes Fases do Ciclo de Produção e Seus Efeitos Sobre Desempenho Produtivo e Qualidade dos Ovos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Botucatu, SP, Brazil, 2011. 58p. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/d866ecc9-3f1e-4417-a647-48ead5a8c2f5/content>. Acessado em: 2 Ago. 2024.

SILVA, B.C.; BILEZIKIAN, J.P. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. **Current Opinion in Pharmacology**, 22, 41–50, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.03.005>.

SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. Tabelas para Codornas Japonesas e Europeias, 2nd ed.; FUNEP: **Jaboticabal**, Brazil, 2009. 107p.

SILVA, J.H.V.; JORDÃO FILHO, J.; COSTA, F.G.P.; LACERDA, P.B.; VARGAS, D.G.V.; LIMA, M.R. Exigências nutricionais de codornas. **Revista Brasileira De Saúde E Produção Animal**, 13, 775–790, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbspa/a/kJDrRVLb6cMr7p6hskmZKzj/?format=pdf&lang=pt>. Acessado em: 16 Jun. 2024.

SILVA, R.C. Trocas de Calor e Desempenho de Codornas Japonesas Confinadas em Ambiente Termoneutro e Sob Estresse Térmico. Tese (Doutor em Engenharia Agrícola), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande—Paraíba, Brasil. 2017. 108p. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/28065>. Acessado em: 4 Jul. 2024.

SINCLAIR-BLACK, M.; GARCIA-MEJIA, R.A.; BLAIR, L.R.; ANGEL, R.; ARBE, X.; CAVERO, D.; ELLESTAD, L.E. Circadian regulation of calcium and phosphorus homeostasis during the oviposition cycle in laying hens. **Poultry Science**, 103, 103209, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103209>.

SOUZA, C.S.; BARRETO, S.L.T.; VIEITES, F.M.; CALDERANO, A.A.; MORAES, G.H.K.; OLIVEIRA, M.G.A. Cálcio e fósforo na nutrição de codornas japonesas em postura. **Science and Animal Health**, 5, 260–281, 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/veterinaria/article/view/9166/8350>. Acessado em: 20 Jul. 2024.

STANQUEVIS, C.E.; FURLAN, A.C.; MARCATO, S.M.; OLIVEIRA-BRUXEL, T.M.; PERINE, T.P.; FINCO, E.M.; GRECCO, E.T.; BENITES, M.I.; ZANCANELA, V.T. Calcium and available phosphorus requirements of Japanese quails in early egg-laying stage. **Poultry Science**, 100, 147–158, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.030>.

STEIN, H.H. Analyzed Values for P and Phytate in Feed Ingredients. Monogastric Nutrition Laboratory, 2023. Disponível em: <https://nutrition.ansci.illinois.edu/node/1753>. Acessado em: 8 Ago. 2024.

SUGIYAMA, T.; KIKUCHI, H.; HIYAMA, S.; NISHIZAWA, K.; KUSUHARA, S. Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. **British Poultry Science**, 48, 233–238, 2007. <https://doi.org/10.1080/00071660701302270>.

SUGIYAMA, T.; KUSUHARA, S. Avian calcium metabolismo and bone function. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 14, 82–90, 2001. Disponível em: https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/7351228. Acessado em: 20 Jul. 2024.

SUZUKI, Y.; KOVACS, C.S.; TAKANAGA, H.; PENG, J.B.; LANDOWSKI, C.P.; HEDIGER, M.A. Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. **Journal of Bone and Mineral Research**, 23, 1249–1256, 2008. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080314>.

TANG, V.W.; GOODENOUGH, D.A. Paracellular ion channel at the tight junction. **Biophysical Journal**, 84, 1660–1673, 2003. <https://doi.org/10.1016/S0006-349574975-3>.

TEYSSIER, J.R.; BRUGALETTA, G.; SIRRI, F.; DRIDI, S.; SAMUEL, J.; ROCHELL, S.J. A review of heat stress in chickens. Part II: Insights into protein and energy utilization and feeding. **Frontiers in Physiology**, 13, 943612, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.943612>.

TIZZIANI, T.; DONZELE, R.F.M.O.; DONZELE, J.L.; BALBINO, E.M.; SILVA, A.D.; FIGUEIREDO, É.M.; MUNIZ, J.C.L.; JACOB, R.F. Available phosphorus levels in diets supplemented with phytase for male broilers aged 22 to 42 days kept in a high-temperature environment. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 45, 48–55, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000200002>.

TRUONG, L.; MILLER, M.R.; SAINZ, R.D.; KING, A.J. Changes in Japanese quail (*Coturnix japonica*) blood gases and electrolytes in response to multigenerational heat stress. **PLoS Climate**, 2, e0000144, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000144>.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. The Mineral Nutrition of Livestock, 3rd ed.; CAB International: **Wallingford, UK**, 1999. Disponível em: <https://www.cabdigitallibrary.org/doi/book/10.1079/9780851991283.0000>. Acessado em: 19 Abr. 2024.

VAN ABEL, M.; HOENDEROP, J.G.J.; BINDELS, R.J.M. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: Regulation and implications for disease. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 371, 295–306, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-1021-2>.

VASCONCELOS, D.M. **Diferentes Níveis Nutricionais e de Fitase Nas Dietas para Codornas Japonesas**. Dissertação de Mestrado, Center for Agricultural Sciences at the Federal University of Paraíba (UFPB), Areia, Paraíba, Brazil, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/14997/1/DZ329.pdf>. Acessado em: 18 Jul. 2024.

VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. **Enzyme and Microbial Technology**, 35, 3–14, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.010>.

Vaz, D. P. **Efeito do cálcio e fósforo disponível na dieta sobre o desempenho produtivo, qualidade óssea e da casca de ovos de galinhas poedeiras por meio de meta-análises**. Tese (Doutor em Zootecnia), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2018.

VERCESE, F. **Efeito da Temperatura Sobre o Desempenho e a Qualidade dos Ovos de Codornas Japonesas**. Dissertação de Mestrado, Graduate Program in Animal Science at São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil. 2010. 70p. Disponível em: <https://www.fmvz.unesp.br/Home/ensino/pos-graduacao768/zootecnia/dissertacoeseses/francine-vercese.pdf>. Acessado em: 2 Mai. 2024.

VERCESE, F.; GARCIA, E.A.; SARTORI, J.R.; SILVA, A.P.; FAITARONE, A.B.G.; BERTO, D.A.; MOLINO, A.B.; PELÍCIA, K. Performance and egg quality of Japanese quails submitted to cyclic heat stress. **Brazilian Journal Poultry Science**, 14, 37–41, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2012000100007>.

VIEIRA, D.V.G.; BARRETO, S.L.T.; VALERIANO, M.H.; JESUS, L.F.D.; SILVA, L.F.F.; MENCALHA, R.; BARBOSA, K.S.; MENDES, R.K.V.; CASSUCE, M.R.; MELO, T.S. Exigências de cálcio e de fósforo disponível para codornas japonesas de 26 a 38 semanas de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 13, 204–213, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbspa/a/NvXwgKTH5RX5gJQmx4DkHsp/?format=pdf&lang=pt>. Acessado em: 3 Jun. 2024.

VIEIRA, S.S. **Desempenho e Qualidade Dos Ovos de Codornas Japonesas (*Coturnix japonica*) Alimentadas com Dietas Contendo Diferentes Níveis Óleo de Palma**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Amazônia, Brasil, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/754>. Acessado em: 20 Mar. 2024.

VITORASSO, G.; PEREIRA, D. F. Análise comparativa do ambiente de aviários de postura com diferentes sistemas de acondicionamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 13, 788–794, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662009000600018>.

VOGADO, G.M.S.; SILVA, L.P. Características Anatômicas e Fatores Genéticos Ligados ao Desenvolvimento Reprodutivo de Codornas de Corte; **Agron Science: Cuddalore, India**, 2023. pp. 119–133. <https://doi.org/10.53934/9786585062046-10>.
WALK, C.L.; BEDFORD, M.R.; SANTOS, T.S.; PAIVA, D.; BRADLEY, J.R.; WLADECKI, H.; HONAKER, C.; MCELROY, A.P. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poultry Science**, 92, 719–725, 2013. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02727>.

WASSERMAN, R.H.; SMITH, C.A.; SMITH, C.M.; BRINDAK, M.E.; FULLMER, C.S.; KROOK, L.; PENNISTON, J.T.; KUMAR, R. Immunohistochemical localization of a calcium pump and calbindin-D28k in the oviduct of the laying hen. **Histochemistry**, 96, 413–418, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00315999>.

WASSERMAN, R.H.; TAYLOR, A.N. Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. **Science**, 152, 794–796, 1966. <https://doi.org/10.1126/science.152.3723.791>.

WASTI, S.; SAH, N.; MISHRA, B. Impact of Heat Stress on Poultry Health and Performances, and Potential Mitigation Strategies. **Animals**, 10, 1266, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10081266>.

WELKER, J.S.; ROSA, A.P.; MOURA, D.J.; MACHADO, L.P.; CATELAN, F.; UTTPATEL, R. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37, 1463–1467, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000800018>.

WILKENS, M.R.; KUNERT-KEIL, C.; BRINKMEIER, H.; SCHRÖDER, B. Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. **The Veterinary Journal**, 182, 294–300, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.020>.

WOYENGO, T.A.; NYACHOTI, C.M. Review: Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. **Canadian Journal of Animal Science**, 91, 177–192, 2011. <https://doi.org/10.4141/cjas10081>.

WU, J.C.Y.; SMITH, M.W.; MITCHELL, M.A.; PEACOCK, M.A.; TURVEY, A.; KEABLE, S.J. Enterocyte expression of calbindin, calbindin mRNA and calcium transport increases in jejunal tissue during onset of egg production in the fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 106, 263–269, 1993. <https://doi.org/10.1016/0300-962990510-B>.

YAMAMOTO, K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. **Annual Review of Genetics**, 19, 209–252, 1985. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.001233>.

YANG, J.H.; HOU, J.F.; FARQUHARSON, C.; ZHOU, Z.L.; DENG, Y.F.; WANG, L.; YU, Y. Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens. **British Poultry Science**, 52, 507–516, 2011. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.596994>.

YU, E.; SHARMA, S. Physiology, Calcium. **StatPearls**, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482128/>. Acessado em: 4 Abr. 2024.

ZHANG, Y.N.; ZHANG, H.J.; WANG, J.; YUE, H.Y.; QI, X.L.; WU, S.G.; QI, G.H. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic zinc on carbonic anhydrase activity in eggshell formation and quality of aged laying hens. **Poultry Science**, 96, 2176–2183, 2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pew490>.

ZHAO, S.C.; TENG, X.Q.; XU, D.L.; CHI, X.; GE, M.; XU, S.W. Influences of low level of dietary calcium on bone characters in laying hens. **Poultry Science**, 99, 7084–7091, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.057>.

3 CAPÍTULO II – SUPERDOSAGEM DE FITASE MODULA OS PARÂMETROS ÓSSEOS E A CONCENTRAÇÃO DO TRANSPORTADOR EPITELIAL DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K EM CODORNAS (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) SOB ESTRESSE TÉRMICO.²

3.1 RESUMO

O estresse térmico causa alterações significativas na biodisponibilidade de minerais em aves poedeiras, especialmente cálcio, resultando em redução na produção de ovos e comprometendo a qualidade dos ovos. Portanto, é necessário usar aditivos que proporcionem melhor disponibilidade de nutrientes e minimizem os efeitos negativos causados pelas altas temperaturas. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da superdosagem de fitase sobre os parâmetros ósseos e a positividade do transportador epitelial de cálcio calbindin-D28K em codornas poedeiras submetidas a diferentes temperaturas. Setecentos e vinte (720) codornas japonesas em fase de produção foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×3 , com cinco níveis de suplementação de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU/kg) e três temperaturas (24°C, 30°C e 36°C), totalizando 15 tratamentos e seis repetições de oito aves cada. O estudo teve início na 8ª semana de idade e continuou por dois ciclos de 21 dias, totalizando 42 dias de experimento. Os parâmetros ósseos das tíbias e a positividade da calbindin-D28K foram mensurados por imuno-histoquímica. Os dados foram submetidos às análises de variância, Tukey e regressão. A 24°C, as aves apresentaram médias maiores para diáfises proximal, medial e distal do que as aves a 30°C e 36°C, e uma maior resistência à ruptura das tíbias do que aquelas a 36°C. Houve um efeito linear crescente na diáfise medial e no índice de Seedor nas tíbias com um nível crescente de suplementação de fitase. O cálcio (Ca) nas tíbias foi maior nas aves mantidas a 30°C em um nível de suplementação de até 1000 FTU de fitase, do que nas aves a 24°C e 36°C, igualando-se a 1500 FTU, e menor a 3000 FTU. Houve um efeito quadrático para o fósforo (P) e a razão Ca:P nas tíbias de codornas submetidas a concentrações crescentes de fitase. Codornas mantidas a 30°C apresentaram maior positividade anti-calbindin-D28K no duodeno e jejuno, quando comparadas aos animais submetidos às temperaturas de 24°C e 36°C. Doses de fitase de 500 e 1000 FTU aumentaram a positividade de calbindin-D28K no duodeno de codornas mantidas a 30°C. Em um nível de suplementação de 1500 FTU, a fitase proporcionou maior espessura da casca do ovo e maior positividade de calbindin-D28K no útero de codornas mantidas a 36°C. Portanto, recomenda-se o uso de 1500 FTU de fitase para codornas japonesas expostas a altas temperaturas. Essas descobertas sugerem que a superdosagem de fitase na dieta pode ajudar a aliviar o estresse térmico em codornas japonesas.

Palavras-chave: transportador de cálcio; enzima exógena; minerais; desempenho; produção; suplementação; estresse térmico; tíbias.

² Artigo Publicado na revista Animal Production Science (Anexo B)

3.2 ABSTRACT

Thermal stress causes significant changes in the bioavailability of minerals, especially calcium, in laying birds, resulting in reduced egg production, and compromising egg quality. Therefore, it is necessary to use additives that provide better nutrient availability and minimise the negative effects caused by high temperatures. This study aimed to evaluate the effects of super-dosing the diet of laying quails submitted to different temperatures with phytase on their bone parameters and on the epithelial calcium transporter calbindin-D28K positivity. Seven hundred and twenty (720) Japanese quails in the production phase were distributed in a completely randomised design, in a 5×3 factorial design, with five supplementation levels of phytase (0, 500, 1000, 1500, and 3000 FTU/kg), and three temperatures (24°C, 30°C and 36°C), totalling 15 treatments, and six replications of eight birds each. The study began at the 8th week of age and continued for two cycles of 21 days, totalling 42 days of experiment. Bone parameters of the tibias and calbindinD28K positivity were measured by immunohistochemistry. The data were submitted to variance, Tukey, and regression analyses. At 24°C, birds had higher averages for proximal, medial, and distal diaphyses than did birds at 30°C and 36°C, and a greater breaking strength of the tibias than did those at 36°C. There was an increasing linear effect on the medial diaphysis and Seedor index in the tibias with an increasing phytase supplementation level. Calcium (Ca) in the tibias was higher in birds kept at 30°C at a supplementation level of up to 1000 FTU of phytase, than in the birds at 24°C and 36°C, equalling at 1500 FTU, and lower at 3000 FTU. There was a quadratic effect for phosphorus (P) and the Ca:P ratio in the tibias of quails submitted to increasing concentrations of phytase. Quails kept at 30°C showed greater anti-calbindin-D28K positivity in the duodenum and jejunum, when compared to animals subjected to temperatures of 24°C and 36°C. Phytase doses of 500 and 1000 FTU increased calbindin-D28K positivity in the duodenum of quails kept at 30°C. At a supplementation level of 1500 FTU, phytase provided greater eggshell thickness and greater calbindin-D28K positivity in the uterus of quails kept at 36°C. Therefore, it is recommended to use 1500 FTU of phytase for Japanese quail exposed to high temperatures. These findings suggest that dietary phytase super-dosing can help alleviate thermal stress in Japanese quail.

Keywords: calcium transporter; exogenous enzyme; minerals; performance; production; supplementation; thermal stress; tibias.

3.3 INTRODUÇÃO

A criação de codornas para produção de ovos tem se tornado uma atividade em ascensão no Brasil, especialmente na região nordeste. Esse setor tem experimentado um crescimento significativo devido ao alto desempenho das codornas como poedeiras, aliado aos baixos custos de investimento para iniciar a produção (Morais *et al.*, 2021). No Brasil onde a maior parte do clima predominante é o tropical, as aves poedeiras enfrentam desafios significativos que afetam sua produção (Silva *et al.*, 2022). O estresse térmico causado pelo calor leva à redução da produção, além do aumento da mortalidade, resultando em perdas econômicas para a indústria (Franzini *et al.*, 2022). Essa situação é especialmente evidente na criação de codornas de postura, pois o aumento da temperatura prejudica a absorção de cálcio, comprometendo a formação da casca dos ovos (Morais *et al.*, 2021).

As concentrações circulantes de cálcio (Ca) são mantidas por meio da absorção intestinal e da reabsorção óssea e renal (Beggs e Alexander, 2017). Quando necessário, o Ca é rapidamente mobilizado do sangue para o útero. Para desempenhar essas funções, o epitélio depende de um importante transportador de Ca, a calbindin-D28k. Essa proteína desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo de Ca no corpo (Moraes *et al.*, 2021).

Aves submetidas ao estresse térmico por calor, sofrem alterações fisiológicas e comportamentais, que afetam severamente a ingestão de ração e causam alterações estruturais no epitélio intestinal, reduzindo a digestibilidade e a absorção de nutrientes (Rostagno, 2020). Aliados a isso, estão os efeitos de fatores antinutricionais como o fitato, que além de tornar o fósforo (P) indisponível, também influencia negativamente a digestão e absorção de outros minerais, aminoácidos e energia (Bernardes *et al.*, 2022; Dallmann *et al.*, 2023).

As fitases são uma classe de enzimas exógenas cuja função é degradar a molécula de fitato (hexafosfato de inositol) presente nos ingredientes da dieta, liberando amido, proteína, aminoácidos, P, Ca e outros nutrientes para serem utilizados pelo animal (Hirvonen *et al.*, 2019; Dang *et al.*, 2022; Sampath *et al.*, 2023). O uso de doses de fitase maiores que as doses comerciais recomendadas tem despertado o interesse de pesquisadores, pois a superdosagem permite uma

degradação mais completa e rápida do fitato, e a consequente liberação de nutrientes (Farias *et al.*, 2021).

A superdosagem de fitase em dietas de aves tem demonstrado efeitos benéficos consistentes, especialmente em relação ao desempenho das aves (Pirgozliev *et al.*, 2011; Pieniazek *et al.*, 2017; Baghban-Kanani *et al.*, 2020; Farias *et al.*, 2021; Dang *et al.*, 2022; Martínez-Vallespín *et al.*, 2022; Sampath *et al.*, 2023), melhorias nas características ósseas (Manobhavan *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016), na digestibilidade de aminoácidos (Dersjant-Li *et al.*, 2022) e na qualidade dos ovos, especialmente as cascas (Rojas *et al.*, 2017; Farias *et al.*, 2021). Vale ressaltar que esses estudos foram conduzidos com galinhas poedeiras e frangos de corte, abrindo assim expectativas de efeitos semelhantes em codornas. O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar os efeitos de uma superdose de fitase sobre os parâmetros ósseos e sobre a positividade do transportador epitelial de Ca calbindin-D28K em codornas poedeiras submetidas a condições termoneutras e estresse térmico.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Local Experimental e Comitê de Ética

O experimento foi conduzido nas câmaras climáticas pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba. O projeto teve aprovação ética do Comitê de Uso e Cuidado de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, sob o protocolo (processo de nº 3695120121). A eutanásia foi realizada por eletronarcose de acordo com as diretrizes do CEUA da referida instituição.

3.4.2 Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizadas 720 codornas japonesas na fase de produção a partir da oitava semana de vida, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×3 , com cinco concentrações de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU) e três temperaturas (24°C, 30°C e 36°C), com seis repetições com oito aves cada (48 animais por tratamento e 240 animais por câmara climática), representando temperaturas termoneutras (24°C) e de estresse térmico (30°C e 36°C), totalizando

15 tratamentos. As codornas iniciaram os tratamentos com 8 semanas de idade e permaneceram por dois ciclos de 21 dias, totalizando 42 dias de experimento.

3.4.3 Alojamento

As aves foram alojadas em 3 câmaras climáticas com dimensões (19,71 m²), cada câmara foi equipada com 30 gaiolas metálicas (55 x 35 x 27cm) com 01 bebedouros tipo nipple e 01 comedouro tipo calha por gaiola. As câmaras contaram com sistema de ar-condicionado, aquecedor, umidificador, desumidificador, exaustor, termostatos e sistema de iluminação. O dimensionamento de aves/gaiola foi de 481,25cm²/ave. O programa de luz fornecido foi o de 17 horas de luz (Luz artificial) durante todo o período experimental.

3.4.4 Dietas Experimentais

As dietas (Tabela 3) foram formuladas segundo recomendação das Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (Rostagno *et al.* 2017), variando apenas a suplementação de fitase. Todas as dietas foram formuladas considerando o que a matriz da enzima disponibiliza com 500FTU (0,165% Ca - 0,150% P).

Tabela 3. Dietas experimentais (Tratamentos T1–T5), contendo cinco níveis de suplementação de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU), considerando a matriz de 500 FTU da enzima, para codornas japonesas na fase de postura.

Item	Unidade	T1 0FTU	T2 500FTU	T3 1000FTU	T4 1500FTU	T5 3000FTU
Ingredientes						
Milho Grão - 7,88%	g/kg	597	597	597	597	597
Soja Farelo 45,22%	g/kg	305	305	305	305	305
Óleo de Soja	g/kg	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67
DL-Metionina	g/kg	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
L-Lisina HCL	g/kg	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
L-Treonina	g/kg	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcário	g/kg	74,4	74,4	74,4	74,4	74,4
Fosfato Bicalcio 18,5%	g/kg	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	g/kg	3,45	3,45	3,45	3,45	3,45
Premix Mineral ^A	g/kg	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix Vitaminico ^B	g/kg	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Colina	g/kg	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Antioxidante	g/kg	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Inerte ^C	g/kg	0,60	0,50	0,40	0,30	0,00
Fitase ^D	g/kg	0,00	0,10	0,20	0,30	0,60

Total		1000	1000	1000	1000	1000
Nutrientes						
Fitase	FTU/kg	0	500	1000	1500	3000
Energia Metabolizável	kcal/kg	2800	2800	2800	2800	2800
Proteína Bruta	g/kg	190	190	190	190	190
Cálcio	g/kg	29,9	29,9	29,9	29,9	29,9
Fósforo Total	g/kg	3,94	3,94	3,94	3,94	3,94
Fósforo Disponível	g/kg	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77
Potássio	g/kg	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32
Sódio	g/kg	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55
Cloro	g/kg	3,19	3,19	3,19	3,19	3,19
Número de Mogin	mEq/kg	164,6	164,6	164,6	164,6	164,6
Aminoácido digestível						
Metionina Dig. Aves	g/kg	6,47	6,47	6,47	6,47	6,47
Met+Cis. Dig. Aves	g/kg	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
Lisina Dig. Aves	g/kg	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07
Treonina Dig. Aves	g/kg	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75
Triptofano Dig. Aves	g/kg	2,07	2,07	2,07	2,07	2,07
Valina Dig. Aves	g/kg	7,98	7,98	7,98	7,98	7,98

T1, Tratamento 1 (0 FTU); T2, Tratamento 2 (500 FTU); T3, Tratamento 3 (1000 FTU); T4, Tratamento 4 (1500 FTU); T5, Tratamento 5 (3000 FTU). Os tratamentos expostos acima foram submetidos a três temperaturas diferentes (24°C, 30°C e 36°C). ^APremix Mineral (concentração/kg de produto): manganês, 60 g; ferro, 80 g; zinco, 50 g; cobre, 10 g; cobalto, 2 g; iodo, 1 g; e selênio, 250 mg. ^BPremix Vitamínico (concentração/kg de produto): vitamina A, 15.000 UI; vitamina D3, 1.500.000 UI; vitamina E, 15.000 UI; vitamina B1, 2,0 g; vitamina B2, 4,0 g; vitamina B6, 3,0 g; vitamina B12, 0,015 g; ácido nicotínico, 25 g; ácido pantotênico, 10 g; vitamina K3, 3,0 g; ácido fólico, 1,0 g. ^CInerte, caulim. ^DEnzima Fitase, 100 g/t fornece 500 FTUs/kg de ração.

A fitase adicionada às dietas experimentais foi de *Escherichia coli* produzida em *Thricoderma reesei* (Quantum Blue, AB Vista, Marlborough, UK), substituindo parte do ingrediente inerte nas dietas.

Os tratamentos consistiram em cinco dietas compostas de milho e farelo de soja, que foram fornecidas em cada câmara climática (24°C, 30°C e 36°C). O tratamento 1 (0 FTU, T1) consistiu em uma dieta controle negativo, sem suplementação de fitase e com concentrações reduzidas de Ca e P. O tratamento 2 (500 FTU, T2) foi uma dieta balanceada com adição de fitase, que seguiu as recomendações para o uso da matriz nutricional de fitase para Ca e P. Os outros tratamentos (1000 FTU (T3); 1500 FTU (T4); 3000 FTU (T5)) continham uma superdose de fitase. As concentrações de fitase foram obtidas pela adição de fitase para substituir o material inerte, considerando as concentrações na dieta controle negativo. As aves tiveram acesso à água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental.

3.4.5 Coleta de órgãos

Ao final do 2º ciclo de produção, 8 aves por tratamento foram escolhidas aleatoriamente e eutanasiadas por eletronarcose, para a coleta de órgãos: intestino delgado (Duodeno, Jejunio) e útero, para as análises de imuno-histoquímica para anti-Calbindin-D28k.

3.4.6 Imuno-histoquímica para anti-Calbindin-D28k

Lâminas histológicas contendo duodeno, jejuno e útero de 8 animais por tratamento foram escolhidas aleatoriamente. O anticorpo utilizado foi o Calbindin-D28k (D-4) (mouse monoclonal immunoglobulin G (Sc 365360, Santa Cruz Biotechnology). As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas, posteriormente foram submetidas ao protocolo do kit EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link) (Referência K8002), Agilent Technologies. As lâminas foram lavadas em banho com Wash Buffer por 2 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento da solução EnVision FLEX Target Retrieval Solution em equipamento banho Maria/Steamer, a uma temperatura de 99°C e por um período de 30 minutos, aguardando a queda de temperatura por mais 20 minutos em temperatura ambiente, posteriormente os tecidos foram lavados em Wash Buffer por 20 minutos. Ao final do processo de recuperação antigênica as lâminas foram encaminhadas para o processo de coloração EnVision FLEX+: Os tecidos eram contornados por caneta histológica (PAP) para confinar o fluxo de reagentes na área dos tecidos, a fim de evitar perdas com reagentes.

Subsequente, as lâminas foram submetidas a solução de EnVision FLEX Peroxidase Block por 5 minutos, sendo lavadas posteriormente em Wash Buffer por 5 minutos. As lâminas foram mantidas por um período de 20 minutos em anticorpo primário, diluído em Wash Buffer (1:500). Os tecidos que receberam o anticorpo anti-Calbindin-D28k foram incubadas como controle positivo e as que receberam apenas o Wash Buffer, como controle negativo. Após um banho de 5 minutos em Wash Buffer, as lâminas foram submetidas ao reagente EnVision FLEX + MOUSE por 15 minutos, para aumentar a amplificação de sinal em 4-5 vezes. Após a lavagem em Wash Buffer por 5 min, as lâminas foram incubadas com EnVision FLEX/HRP por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido por lavagem em Wash Buffer por 5 minutos e posterior adicionadas em EnVision FLEX Substrate Working Solution por 5 minutos, sendo

lavadas em seguida em Wash Buffer por 5 minutos. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. As fotomicrografias foram realizadas pelos programas KS-400 Zeiss sob microscópio Olympus BX60 e câmera AxioCam. Quanto mais anticorpo-positivo, maior a produção de proteína de Calbindin-D28k. Portanto, a positividade pode ser vista no tecido pela coloração do cromogênio DAB em marrom; ou seja, a coloração marrom demonstra a localização da proteína Calbindin-D28k no tecido (proteína citoplasmática).

3.4.7 Análise de resistência óssea e índice de Seedor

Após a eutanásia do ciclo 2, as tíbias de 8 aves por tratamento foram coletadas para análises de composição e resistência óssea. Para análise da composição óssea de minerais, utilizou-se as tíbias direitas de 8 aves, já para a análise de resistência, utilizou-se as 8 tíbias esquerdas dessas mesmas aves, que foram identificadas e congeladas em freezer. Posteriormente, foram descongeladas e realizada a desossa, fazendo a limpeza dos tecidos aderentes, sem provocar injúrias na estrutura óssea a fim de serem submetidas à pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 48 horas. Após secagem, registrou-se as medidas de comprimento com auxílio de um paquímetro digital e pesagem das tíbias, para cálculo do índice de Seedor, a fim de fornecer uma estimativa da densidade óssea (quantidade de minerais por unidade de área ou volume), por meio da relação peso (mg) e comprimento (mm) do osso, segundo Seedor *et al.* (1991).

$$\text{Índice de Seedor} = \text{peso dos ossos (mg)} / \text{comprimento (mm)}.$$

A análise de resistência foi realizada com as tíbias *in natura*, utilizando um texturômetro universal (Modelo TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido), com uma célula de carga de 50 kg a uma velocidade de 30 mm/min. Um programa computacional registrou a força (kgf) necessária para ocorrer à quebra total do osso.

3.4.8 Densitometria computadorizada

A tomografia computadorizada foi realizada em 8 tíbias por tratamentos (tíbias esquerdas) através do equipamento de scanner Hi-speed FX1 CT (General Electric, Fairfield, CT 06824, USA) pertencente ao laboratório FOCUS. Os ossos foram colocados lado a lado na mesa de exame para obtenção das imagens. As imagens transversais foram obtidas através de cortes seccionais de 2 mm de espessura em um intervalo de reconstrução de 1 mm, 120 KV e corrente automática do tubo (mA) na velocidade de uma rotação por segundo. As imagens geradas pela tomografia computadorizada consistem em seções seccionais que permitem a localização precisa da região de interesse para a identificação de alterações na densidade do tecido ósseo. Os valores de densidade óssea obtidos por meio da avaliação tomográfica quantitativa correspondem à atenuação média dos pixels contidos na região de interesse selecionada, dados em unidades de Hounsfield (Chalmers *et al.*, 2006; Adams, 2009).

Posteriormente, as imagens foram analisadas com o software Dicom (versão 1.1.7, Horos, Purview, Annapolis, MD 21401, USA; <https://horosproject.org/>) para estimar os valores individuais da radiodensidade óssea em três níveis de corte diferentes da diáfise (proximal, medial e distal). Cada região foi dividida em quatro quadrantes e uma região de interesse circular (ROI) selecionada para avaliação densitométrica do osso cortical (Figura 6). Os resultados foram apresentados em uma unidade de Hounsfield (HU), posteriormente corrigidos e convertidos em mg/cm^3 de hidroxiapatita de cálcio, usando a equação $\text{BMD} = 200 \text{ HU}_t / (\text{HU}_w - \text{HU}_b)$, conforme metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2012) e Simões de Souza *et al.* (2018).

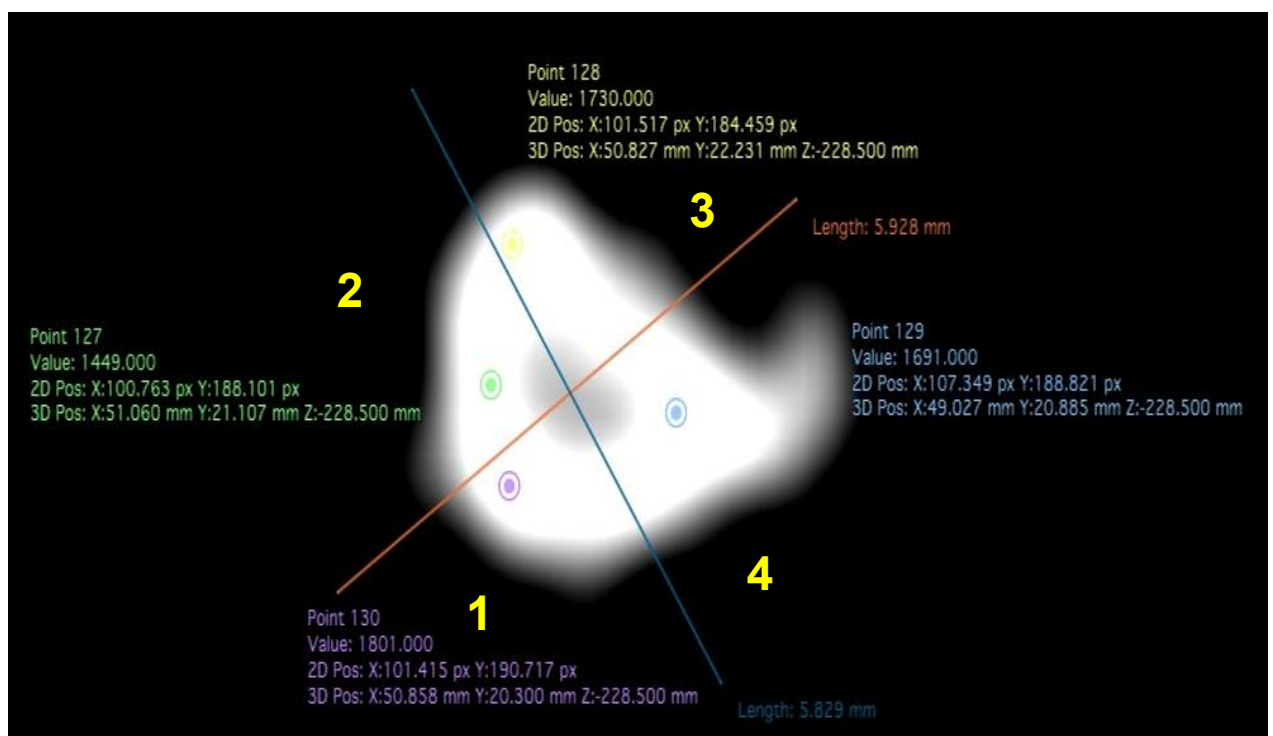


Figura 6 - Imagem tomográfica em corte transversal da tíbia de codorna japonesa

3.4.9 Minerais na tíbia

Para a análise, foram utilizadas as tíbias anteriormente submetidas à resistência óssea. As 8 tíbias de cada tratamento foram utilizadas para compor uma amostra composta, originando 4 repetições por tratamento. Depois de descongelados, os ossos seguiram para estufa a 105 °C permanecendo por 24 horas e em seguida foram calcinados em mufla (Modelo 2000F, Zezimaq, Minas Gerais, BR) por 4 horas a 600°C (Yan *et al.*, 2005). Após determinação das cinzas, aproximadamente 0,5 g da amostra foram digerida em 10 ml de ácido clorídrico (37% PA) na concentração 1:1, em sistema aberto por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo e posteriormente diluídas em água deionizada até produzir um volume final de 50 ml de solução mineral, conforme recomendado por Silva and Queiroz (2006).

A concentração de fósforo foi analisada por espectrometria em espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-5100 (Metash Instruments, Shanghai, China) de acordo com metodologia proposta por Rangana (1979). A concentração de cálcio foi analisada em espectrômetro de absorção atômica, com atomizador de chama, modelo ICE 3500 (Thermo scientific, Cambridge, UK). Lâmpadas de cátodo oco (Photron, Victoria, Austrália), contendo o mineral a ser analisado (Ca) foram utilizadas como fonte de radiação primária e a correção de fundo foi feita com uma lâmpada de deutério acoplada ao equipamento.

As curvas padrão foram preparadas com padrões específicos para cada elemento químico (Specsol, São Paulo, Brasil). Os parâmetros instrumentais foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante e os dados foram processados utilizando-se o software SOLAAR (Thermo scientific, Cambridge, UK). Para todas as análises foi utilizada a chama de ar-acetileno para a atomização da amostra. Para a análise de Ca, as amostras foram adicionadas de lantânio (La) até atingir uma concentração final de 0,1% de La. A relação cálcio:fósforo (Ca:P) foi obtida dividindo-se a percentagem de Ca pela de P nas cinzas.

3.4.10 Consumo de ração, produção total de ovos e espessura da casca dos ovos

Foram avaliados os parâmetros de consumo de ração (CR, g/ave. dia), produção total de ovos (PTO, %) e espessura da casca do ovo (EC, mm). O período de avaliação de desempenho foi dividido em dois ciclos de 21 dias. No final de cada período, a ração restante de cada parcela foi coletada para calcular o CR. O CR foi determinado pela divisão da diferença entre a ração fornecida durante a fase de tratamento e a ração restante pesada no final da fase pelo número de aves na gaiola. As médias foram totalizadas para resultar no CR médio por ave na gaiola (g/ave. dia).

A produção de ovos foi calculada pela coleta do número de ovos produzidos diariamente, sempre corrigindo pela mortalidade, de forma que o número de ovos intactos produzidos fosse expresso como uma porcentagem para cada tratamento, sobre o número médio de aves por período (%/ave/dia), que correspondeu à produção de ovos comercializáveis.

No final de cada ciclo de produção, quatro ovos foram selecionados por parcela experimental ou gaiola. As cascas foram quebradas ao meio (região equatorial), lavadas e depois secas em estufa a 55°C por 24 h. A EC foi posteriormente analisada e determinada com o auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo, resolução 0,001 mm) na linha média do ovo, sendo 3 medidas por ovo (regiões apical, equatorial e basal).

3.4.11 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a ANOVA, usando o software estatístico R ver. 4.2.0 (R Core Team 2022) para determinar os efeitos de diferentes concentrações de fitase e faixas de temperatura nas variáveis medidas. Para variáveis que mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$), o teste de Tukey foi conduzido para comparar as médias em diferentes temperaturas. Além disso, a análise de regressão foi empregada para identificar a concentração ótima de fitase.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

onde:

Y_{ijkl} = Variável resposta, μ = Média geral, α_i = Efeito do i-ésimo nível de fitase, β_j = Efeito da j-ésima faixa de temperature, $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efeito de interação entre o i-ésimo nível de fitase e a j-ésima faixa de temperature, ϵ_{ijkl} = Termo de erro aleatório associado a cada observação, assumido como normalmente distribuído com média zero e variância constante.

Em caso de significância para fitase, o seguinte modelo foi aplicado:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$$

Onde:

Y_i = A variável de resposta para a i-ésima observação, β_0 = O intercepto, representando o valor esperado de Y quando a fitase está em zero (nível de base), X_i = Nível de fitase para a i-ésima observação, β_1 = A inclinação, indicando o efeito de um aumento de uma unidade na fitase na variável de resposta, ϵ_i = Termo de erro aleatório para a i-ésima observação, assumido como distribuído normalmente com média zero e variância constante.

3.5 RESULTADOS

Durante o período experimental não foi registrada mortalidade das aves, pois elas estavam saudáveis e não manifestaram nenhuma doença.

3.5.1 Parâmetros ósseos das tíbias

A partir da análise da radiodensidade nas diferentes regiões das tíbias (Tabela 4), observou-se que a concentração de fitase não teve influência significativa nos valores das diáfises proximal e distal, nem na interação entre temperatura e fitase ($P > 0,05$). Entretanto, houve efeito notável em relação às diferentes temperaturas avaliadas. Especificamente, as aves mantidas a 24°C apresentaram densidade média significativamente ($P < 0,001$) maior nas diáfises proximal, medial e distal do que os grupos mantidos nas temperaturas de 30°C e 36°C.

Em relação à diáfise medial, notamos efeito linear crescente ($P = 0,034$) em relação às concentrações de fitase. Com o aumento da concentração de fitase adicionada à dieta, a densidade para essa variável aumentou. Nenhum efeito foi observado na interação temperatura versus fitase ($P > 0,05$).

Tabela 4 - Valores médios de radiodensidade em diferentes regiões da tíbia de codornas japonesas alimentadas com superdosagem de fitase em diferentes ambientes térmicos.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Fitase	Temp x Fit	Regressão
Diáfises (mg/cm ³)												
Proximal	24	1059	814	1058	997	975	981a					
Proximal	30	754	760	829	908	800	810b	16,30	<0,001	0,055	0,949	NS
Proximal	36	861	821	793	856	949	856b					
	Média	891	798	893	921	908						
Medial	24	965	870	1110	1030	1012	997a					
Medial	30	719	716	877	861	821	799b	19,10	<0,001	0,050	0,719	0,034*
Medial	36	901	784	847	861	944	867b					
	Média	862	790	944	917	926						
Distal	24	952	896	1034	958	960	960a					
Distal	30	715	715	758	862	724	754b	19,30	<0,001	0,643	0,538	NS
Distal	36	878	771	760	791	855	811b					
	Média	848	794	851	870	846						

CV% = Coeficiente de variação; NS = não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Efeito Linear ($y = 0,0313x + 850,28$; $R^2 = 0,3299$). Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

Os resultados obtidos para o índice Seedor (Tabela 5) demonstraram efeito linear ($P = 0,0012$), aumentando conforme as concentrações de fitase aumentaram. Nenhum efeito foi observado para temperaturas, nem para a interação entre temperatura e fitase ($P > 0,05$).

As médias obtidas para a resistência da tíbia (Tabela 5) demonstraram efeito significativo ($P = 0,0147$) apenas a 24°C, com aumento da força de ruptura das tíbias quando comparadas às aves a 36°C. Não foi observado efeito para a concentração de fitase, nem para a interação entre temperatura e fitase ($P > 0,05$).

Na análise da concentração de Ca nas tíbias (Tabela 5), notamos um impacto significativo ($P < 0,001$) da interação entre temperatura e concentração de fitase. Maiores concentrações de Ca foram observadas em aves mantidas a 30°C, do que naquelas a 24°C e 36°C, e em concentrações crescentes de fitase, de até 1000 FTU. Entretanto, a 1500 FTU, as concentrações de Ca se tornaram iguais entre as diferentes temperaturas. A 3000 FTU, as concentrações de Ca a 30°C e 36°C foram menores do que aquelas a 24°C.

Na tíbia (Tabela 5), houve efeito quadrático significativo ($P = 0,018$) da concentração de fitase na concentração de P. À medida que a concentração de fitase aumentou na dieta, as concentrações de P também aumentaram na tíbia, atingindo um pico em 1600 FTU de fitase (Tabela 6). Também foi observado efeito entre as temperaturas ($P = 0,007$). As aves submetidas a temperaturas de 30 °C demonstraram maiores concentrações de P nas tíbias do que as aves submetidas a temperaturas de 24 °C e 36 °C. Não houve interação entre temperatura e concentração de fitase ($P = 0,075$).

Na relação Ca:P das tíbias (Tabela 5), houve efeito quadrático ($P = 0,0032$). À medida que as concentrações de fitase aumentaram, a relação Ca:P reduziu, atingindo um ponto mínimo da relação em 1500 FTU de fitase na dieta (Tabela 6). Não

Tabela 5 - Parâmetros ósseos das tíbias de codornas japonesas alimentadas com superdosagem de fitase em diferentes ambientes térmicos.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperatura	Fitase	Temp x Fit	Regressão
Índice de Seedor (mg/mm)	24	12,27	12,12	13,05	12,32	12,65	12,48	9,20	0,495	0,004	0,328	0,012*
	30	11,60	12,12	13,30	14,04	12,90	12,79					
	36	12,31	12,30	12,97	13,03	13,23	12,77					
	Média	12,06	12,18	13,11	13,13	12,93						
Resistência óssea (Kgf)	24	5,36	4,79	5,80	5,24	4,67	5,17a	22,50	0,015	0,350	0,927	NS
	30	5,12	4,52	5,18	4,95	4,62	4,88ab					
	36	4,26	4,62	4,54	4,31	4,30	4,41b					
	Média	4,91	4,64	5,17	4,83	4,53						
Cálcio (g/100g)	24	13,79b	11,87b	13,52b	15,05a	15,89a	14,02	7,20	<0,001	0,365	<0,001	NS
	30	16,24a	16,99a	16,65a	15,05a	13,52b	15,69					
	36	15,34ab	13,75b	14,13b	14,09a	13,59b	14,18					
	Média	15,12	14,20	14,77	14,73	14,33						
Fósforo (g/100g)	24	5,55	4,59	6,55	6,70	6,46	5,97b	17,60	0,007	0,040	0,075	0,019**
	30	5,55	7,75	9,11	7,68	6,14	7,25a					
	36	6,38	5,77	6,38	6,19	6,12	6,17b					
	Média	5,83	6,04	7,35	6,85	6,24						
Relação Ca:P	24	2,59	2,59	2,09	2,26	2,59	2,42	13,70	0,433	0,005	0,291	0,003**
	30	2,94	2,30	1,87	2,03	2,22	2,27					
	36	2,40	2,42	2,29	2,29	2,31	2,34					
	Média	2,64	2,44	2,08	2,19	2,37						

CV% = Coeficiente de variação; NS = Não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Kgf = Quilograma força; * Efeito Linear ($y = 0,0003x + 12,322$; $R^2 = 0,426$); ** Efeito Quadrático ($y = -5E-07x^2 + 0,0016x + 5,7276$; $R^2 = 0,7211$), Ponto Máximo 1600; ** Efeito Quadrático ($y = 2E-07x^2 - 0,0006x + 2,6478$; $R^2 = 0,873$), Ponto Mínimo 1500. Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU)

foi observado efeito da temperatura ($P = 0,4332$) ou interação temperatura-fitase na relação Ca:P ($P = 0,2909$).

Tabela 6 - Equações de regressão dos parâmetros ósseos de tíbias em codornas japonesas alimentadas com superdosagem de fitase em diferentes ambientes térmicos.

Parâmetros	Efeito	Equações	R ²	Nível
Diáfise Medial	Linear	$y = 0,0313x + 850,28$	0,330	-
Índice de Seedor	Linear	$y = 0,0003x + 12,322$	0,426	-
Fósforo	Quadrático	$y = -5E-07x^2 + 0,0016x + 5,7276$	0,721	1600 ^{Max}
Relação Ca/P	Quadrático	$y = 2E-07x^2 - 0,0006x + 2,6478$	0,873	1500 ^{Min}

3.5.2 Imuno-histoquímica

Os três órgãos estudados (duodeno, jejuno e útero) nas codornas foram positivos para o transportador epitelial de Ca, calbindin-D28K (Tabela 7). Nos segmentos intestinais (duodeno e jejuno), a positividade ocorreu nos enterócitos. Maior positividade anti-calbindinD28K foi observada no duodeno, quando comparado ao jejuno (Figura 7a, b).

Tabela 7 - Positividade para o anticorpo Calbindin-D28K, um transportador de cálcio, no duodeno, jejuno e útero de codornas japonesas submetidas a diferentes temperaturas.

Duodeno					
Temperatura	0 FTU	500 FTU	1000 FTU	1500 FTU	3000 FTU
24°C	++	++	++	++	++
30°C	++	+++	+++	++	++
36°C	++	++	++	++	+++
Jejuno					
	0 FTU	500 FTU	1000 FTU	1500 FTU	3000 FTU
24°C	++	++	+++	++	+
30°C	++	+++	++	++	++
36°C	+	++	++	++	+
Útero					
	0 FTU	500 FTU	1000 FTU	1500 FTU	3000 FTU
24°C	++	+++	++	++	+++
30°C	++	++	+++	++	+++
36°C	++	+++	++	+++	+++

*0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU referem-se à suplementação de fitase na dieta de codornas japonesas. A positividade do anticorpo foi avaliada a partir de cruzes (+, pouca positividade; ++: positividade moderada; e +++: extensa positividade). Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

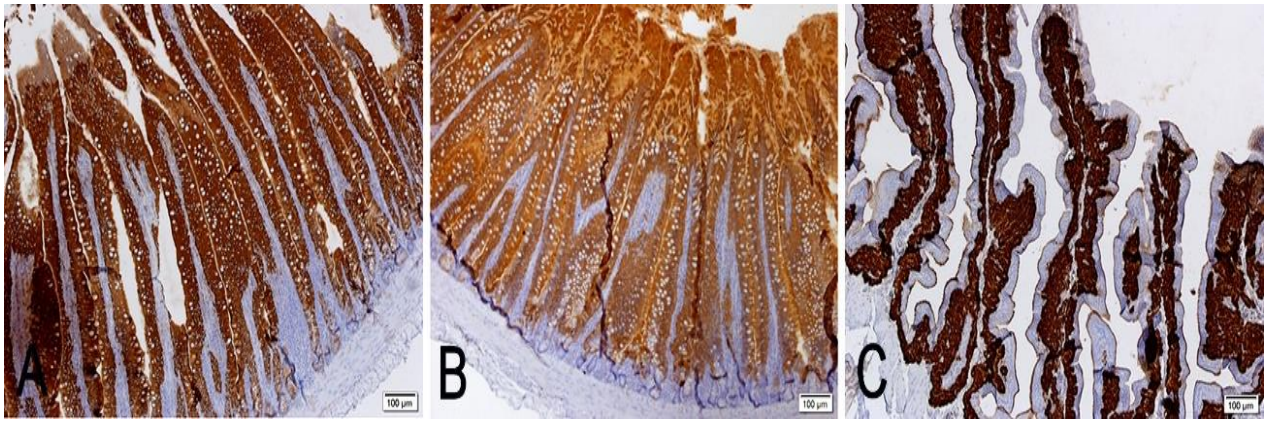


Figura 7. Fotomicrografias de órgãos de codornas japonesas com positividade ao anticorpo, transportador epitelial de cálcio, CalbindinD28K. A) Intestino delgado, porção duodeno. Observar positividade no epitélio, porém não na lâmina própria da mucosa. B) Intestino delgado, porção jejuno. Observar positividade no epitélio, porém não na lâmina própria da mucosa. C) Útero. Observar positividade nas glândulas uterínicas, porém não no epitélio. Imunohistoquímica para anti-CalbindinD28K, contracorada com hematoxilina.

No útero, a positividade ocorreu nas glândulas uterinas, encontradas abaixo do epitélio, nas dobras uterinas, sendo que o epitélio não é positivo a esse transportador (Figura 7c).

No presente estudo, observamos uma menor positividade para calbindin-D28K no epitélio duodenal em codornas mantidas na temperatura de conforto térmico (24°C). Menor CR ($P < 0,001$) e positividade para calbindin-D28K também foram observados no jejuno (Figura 8) de codornas mantidas a 36°C (Tabela 8).

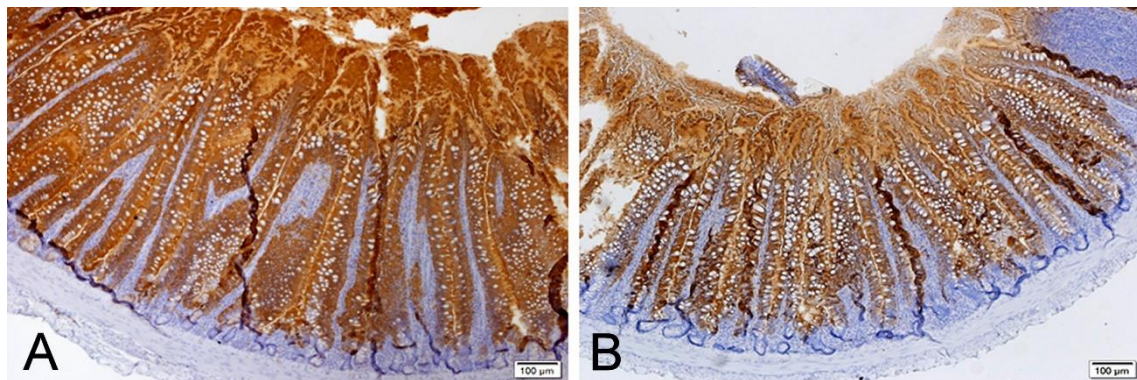


Figura 8. Fotomicrografias de jejuno de codornas japonesas com positividade ao anticorpo, transportador epitelial de cálcio, CalbindinD28K. A) Jejuno representativo de codornas em ambiente de 24 ou 30°C. B) Jejuno de codornas em ambiente de 36°C, apresentando menor positividade ao anti-CalbindinD28K. Imunohistoquímica para anti-CalbindinD28K, contracorada com hematoxilina.

Em contraste, o maior PTO (Tabela 8) e a maior positividade anti-calbindin D28k ocorreram nas células epiteliais intestinais do duodeno e jejuno em codornas mantidas a 30°C ($P < 0,001$).

Tabela 8 - Valores médios de consumo de ração (CR), produção total de ovos (PTO) e espessura da casca do ovo (EC) de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperatura	Fitase	Temp x Fit	Regressão
CR, g/bird/day	24	18,93	19,70	19,60	19,48	19,85	19,51a	7,74	<0,001	0,349	0,961	NS
	30	19,71	19,98	20,31	20,00	19,41	19,90a					
	36	15,02	16,18	16,48	16,12	15,47	15,86b					
	Média	17,89	18,62	18,80	18,53	18,24						
PTO, %	24	66,01	66,75	68,07	70,07	65,37	67,25b	11,67	<0,001	0,761	0,927	NS
	30	80,55	76,30	82,28	80,74	77,12	79,40a					
	36	66,37	64,94	64,31	61,51	62,57	63,94b					
	Média	70,98	69,33	71,56	70,78	68,35						
EC, mm	24	0,43a	0,41a	0,41a	0,40b	0,41a	0,41	3,60	0,118	0,033	<0,001	NS
	30	0,40b	0,40a	0,41a	0,40b	0,41a	0,40					
	36	0,39b	0,40a	0,39a	0,44a	0,41a	0,41					
	Média	0,41	0,40	0,41	0,42	0,41						

CV% = Coeficiente de variação; NS = Não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase, pelo teste de Tukey (p<0,05). Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

Também foi observado que o uso de fitase nas doses de 500 e 1000 FTU para aves submetidas a 30°C aumentou a positividade da calbindin-D28K no duodeno. Outro resultado importante foi que a fitase na concentração dietética de 1500 FTU aumentou a EC (Tabela 8) na temperatura mais alta (36°C), quando comparado ao tratamento sem fitase na mesma temperatura ($P < 0,001$). Este resultado também foi corroborado pela maior positividade para anti-calbindinD28K no útero das codornas nos tratamentos com fitase (Figura 9).

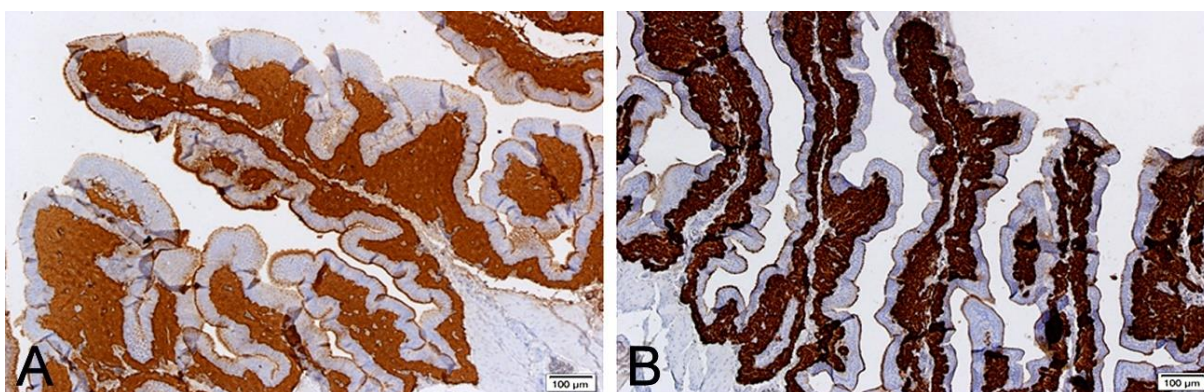


Figura 9 - Fotomicrografias de úteros de codornas japonesas com positividade ao anticorpo, transportador epitelial de cálcio, CalbindinD28K. A) Útero de codornas sem suplementação com Fitase na dieta. B) Útero de codornas submetidas à suplementação com Fitase em sua dieta, apresentando maior positividade ao anti-CalbindinD28K. Imunohistoquímica para anti-CalbindinD28K, contracorada com hematoxilina.

Maior positividade anti-calbindinD28K também foi observada no duodeno de codornas suplementadas com 3000 FTU a 36°C, do que a 24°C e 30°C. Esses resultados também foram associados à manutenção da EC das codornas sob estresse térmico (36°C), quando comparadas com as cascas dos ovos das codornas em temperaturas termoneutras (24°C). Maior positividade anti-calbindinD28K também foi observada no útero de codornas suplementadas com fitase (3000 FTU), do que no das aves que não receberam a enzima.

3.6 DISCUSSÃO

O estresse térmico por calor (ETC) atraiu a atenção dos produtores de aves por causa de seus impactos prejudiciais, especialmente em aves poedeiras em regiões de clima tropical. O estresse térmico desencadeia uma série de mudanças fisiológicas,

como estresse oxidativo, distúrbios no equilíbrio ácido-base e enfraquecimento do sistema imunológico. Essas mudanças culminam em um aumento na taxa de mortalidade e uma diminuição na eficiência alimentar, bem como uma redução no peso corporal, consumo de ração, produção de ovos (Wasti *et al.*, 2020) e desenvolvimento ósseo (Zhang *et al.*, 2021). A pesquisa está tentando encontrar estratégias para mitigar os efeitos do estresse térmico.

3.6.1 Parâmetros ósseos das tíbias

Em nossa pesquisa, a exposição de aves a altas temperaturas demonstraram ser prejudicial à integridade da tíbia e à sua densidade óssea. Codornas mantidas sob estresse térmico severo (36°C) apresentaram os piores índices de densitometria óssea e resistência tibial principalmente quando comparadas com aves mantidas em temperatura de conforto (24°C). Uma causa óbvia dessa redução na qualidade e massa óssea está associada à ingestão deficiente de Ca, porque o ETC reduz o CR e a absorção de nutrientes e vitaminas, que são importantes para a formação óssea (Zhang *et al.*, 2021).

Estudos anteriores apoiam o papel negativo do ETC na regulação da saúde óssea das aves. Por exemplo, Koelkebeck *et al.* (1993) observaram que em galinhas poedeiras submetidas a altas temperaturas ambientais, houve uma redução da massa óssea das tíbias. Sahin *et al.* (2009) mostraram que codornas submetidas a ETC exibiram uma diminuição significativa na densidade mineral óssea e cinzas tibiais do que aquelas em ambiente termoneutro. Resultados semelhantes foram descritos por Jankowski *et al.* (2015), ao avaliar os efeitos da densidade populacional e do estresse térmico em perus, onde observaram uma redução da densidade mineral óssea das tíbias em animais submetidos a altas temperaturas. Zhang *et al.* (2021), trabalhando com frangos de corte (Ross 308) de 1 a 39 dias de idade, observaram uma menor resistência das tíbias em aves quando submetidas ao ETC. Esses achados apoiam os resultados do nosso estudo de que temperaturas elevadas são prejudiciais à integridade e densidade óssea das tíbias.

Diversas estratégias nutricionais têm sido utilizadas para atenuar os efeitos negativos do ETC na saúde óssea das aves (Hosseini-Vashan *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). A fitase destaca-se como uma proposta para atenuar os

efeitos do estresse térmico, pois além de possibilitar a degradação da molécula de fitato presente nos ingredientes das dietas, liberando fósforo e cálcio (Hirvonen *et al.*, 2019), importantes para o desenvolvimento corporal e ósseo dos animais (Lee *et al.*, 2019), também liberam no processo, minerais e vitaminas, como por exemplo zinco e vitamina D, que estão ligados ao desenvolvimento ósseo (Zhang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021) e também atuam como fatores antioxidantes, removendo os radicais livres e protegendo as membranas celulares do estresse oxidativo causados pelas altas temperaturas.

A utilização de doses de fitase superiores às recomendações comerciais (Dersjant-Li *et al.*, 2014) tem despertado o interesse de pesquisadores, pois a superdosagem permite uma degradação mais completa e rápida do fitato nos ingredientes dietéticos, juntamente com uma maior disponibilidade de nutrientes (Cowieson *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2021).

O uso de concentrações crescentes de fitase em nosso estudo teve um impacto linear positivo na densidade da diáfise medial da tíbia e no índice de Seedor, demonstrando um aumento significativo na densidade óssea. Demonstrou-se que esse efeito está diretamente relacionado ao aumento da disponibilidade e retenção de minerais essenciais, como Ca e P, causado pela ação da fitase na quebra do fitato (Gautier *et al.*, 2018; Broch *et al.*, 2021).

Dersjant-Li *et al.* (2018) demonstraram que, ao aumentar a concentração de fitase na dieta de 500 para 1000 FTU/kg, houve um aumento notável na digestibilidade ileal de P e Ca, juntamente com um aumento no conteúdo mineral dos ossos. Ao avaliar os efeitos de dois níveis de suplementação de fitase na dieta de frangos de corte, Sens *et al.* (2021) também observaram que a suplementação com uma dose maior de fitase (2500 FTU) resultou em maior conteúdo de cinzas e índice de Seedor nos ossos da tíbia. Esses resultados concordam com nossas observações de uma maior densidade na região da diáfise média e um maior índice de Seedor nas tíbias à medida que a concentração de fitase na dieta aumenta.

As codornas são notavelmente mais tolerantes ao estresse térmico do que os frangos de corte ou galinhas poedeiras. Isso se deve à maior relação área de superfície: volume corporal, proporcionando às codornas uma maior capacidade de dissipar calor endógeno (Porto *et al.*, 2021). Para codornas poedeiras, a faixa de temperatura de conforto térmico está entre 21 °C e 27 °C (Alagawany *et al.*, 2017).

Quando as codornas enfrentam condições de estresse térmico em decorrência do calor, há uma possível alteração no equilíbrio ácido-base do sangue, bem como na regulação de eletrólitos como potássio, sódio e Ca. Elas geralmente recorrem à respiração rápida e superficial (ofegação) para promover a perda de calor por evaporação, tentando assim manter a temperatura corporal (Vercese *et al.*, 2012).

Durante a respiração ofegante, a excreção de CO₂ ocorre em uma taxa maior do que a produção celular de dióxido de carbono (CO₂), o que altera o sistema tampão de bicarbonato padrão no sangue (Fisinin e Kavtarashvili, 2015). A redução de CO₂ leva a uma diminuição na concentração de ácidos carbônicos (H₂CO₃) e íons de hidrogênio (H⁺). Além disso, a concentração de íons de bicarbonato (HCO₃⁻) aumenta, elevando assim o pH do sangue, ou seja, o sangue se torna alcalino. Para gerenciar esse cenário e preservar o equilíbrio do pH do sangue, as aves iniciam um processo de aumento da excreção de íons de bicarbonato (HCO₃⁻) e retenção de íons de hidrogênio (H⁺) pelos rins. O H⁺ elevado altera o equilíbrio ácido-base, levando à alcalose respiratória (Wasti *et al.*, 2020). Essa desregulação pode afetar a qualidade da casca do ovo, funções enzimáticas, síntese de proteína tecidual e absorção de Ca (Truong *et al.*, 2023). Tais efeitos adversos podem ser reduzidos com o uso da fitase, devido à maior liberação de nutrientes, energia, fatores antioxidantes e estabilidade do pH sanguíneo, aumentando assim a disponibilidade de minerais, como o Ca.

Conforme destacado por da Silva *et al.* (2009), a eficiência de absorção de Ca aumenta proporcionalmente à necessidade crescente desse mineral. Embora as codornas sejam capazes de suportar temperaturas de até 30°C, observou-se que essas aves requerem maiores quantidades de vitaminas e minerais em sua dieta, devido a alterações em seu metabolismo (Truong *et al.*, 2023). No contexto do nosso estudo, verificamos que a inclusão de fitase em concentrações de até 1000 FTU na dieta de codornas mantidas a 30°C resultou em impactos positivos nas concentrações de Ca nas tíbias, quando comparadas com outras condições térmicas. Esses achados demonstraram a eficácia da enzima em promover a liberação de nutrientes nas aves. Além disso, confirma que em temperaturas de 30°C, onde a demanda por Ca é maior do que a 24°C, as aves demonstraram maior eficiência no uso do Ca da dieta. Ao analisar a relação entre Ca e P nas tíbias, observamos uma diminuição dessa relação em concentrações de fitase de 1500 FTU. Essa redução pode ser explicada pelo efeito da fitase em aumentar a disponibilidade de P nas dietas, o que resultou em uma redução na relação, porque o conteúdo de Ca não mudou.

3.6.2 Imuno-histoquímica

Nas codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), cerca de 10% do Ca corporal total é direcionado diariamente para a formação de cascas de ovos, como carbonato de Ca (Bar, 2008; Nys e Le Roy, 2018; Stapano *et al.*, 2020). As principais fontes desse mineral para a formação da casca do ovo são a absorção alimentar no intestino, a reabsorção renal e a reabsorção dos ossos. Calbindin-D28k é uma proteína iônica intracelular de ligação ao Ca (Ca^{2+}), que atua como um transportador de Ca da membrana apical para a membrana basolateral e está envolvida na mobilização de Ca^{2+} no intestino (absorção), rim (absorção) e nas glândulas uterinas (liberação) (Wang *et al.*, 2022). Ela demonstra a capacidade não apenas de influenciar a absorção intestinal, mas também de modular a deposição desse mineral no útero. Essa capacidade afeta potencialmente não apenas a produção, mas também a qualidade das cascas dos ovos (Moraes *et al.*, 2021).

De acordo com Sugiyama *et al.* (2007), há uma diferença na expressão de calbindin-D28K em diferentes segmentos intestinais. Isso está relacionado à quantidade de receptores de vitamina D (receptor de vitamina D, VDR) em sua forma metabolicamente ativa, 1,25-di-hidroxivitamina D3 [$1,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$], em cada segmento intestinal. Como o duodeno é a primeira porção anatômica do intestino, ele exibe uma distribuição mais proeminente de íons Ca^{2+} destinados à absorção do que o jejuno. Como resultado, ele tem um número maior de transportadores, como calbindin-D28K, para facilitar uma absorção mais eficiente (San *et al.*, 2021). Esta observação é consistente com os achados de estudos conduzidos por Wu *et al.* (1993), Sugiyama *et al.* (2007) e Moraes *et al.* (2021) em poedeiras, onde foi encontrada maior expressão positiva do transportador de Ca calbindin-D28K nas regiões iniciais do intestino, sendo mais pronunciada no duodeno do que no jejuno, especialmente nas porções apicais das vilosidades.

Localizadas abaixo do epitélio, as glândulas uterinas são positivas para anticalbindin-D28K, pois desempenham um papel crucial na produção e liberação de carbonato de Ca (CaCO_3), que é produzido e liberado para produzir uma casca de ovo no útero. Esse processo é influenciado pela concentração de estrogênio circulante (Corradino *et al.*, 1993) e regula tanto a produção de ovos quanto a qualidade da casca do ovo. As células da glândula uterina transferem Ca da porção basal para a

superfície apical durante a síntese de CaCO_3 (Moraes *et al.*, 2021). Quanto maior a quantidade de CaCO_3 , mais rápida será a produção de ovos e/ou melhor será a qualidade da casca do ovo (Stapane *et al.*, 2020). O epitélio (ciliado pseudoestratificado) não é positivo para anticalbindin-D28k, porque sua função é produzir mucina para ajudar no trânsito do ovo.

Nossos resultados corroboram com os de Moraes *et al.* (2021). Eles encontraram maior positividade anti-calbindin-D28K nas glândulas uterinas de codornas japonesas submetidas às temperaturas de 24°C e 28°C, demonstrando a importância dessa área para a mobilização de Ca para a formação das cascas dos ovos. Eles também observaram a ausência do transportador de Ca no epitélio das glândulas uterinas.

Em nossa pesquisa, observamos que codornas, quando submetidas a temperaturas de conforto térmico, apresentaram menor positividade ao transportador calbindin-D28K no epitélio duodenal. Isso pode estar relacionado a uma menor demanda por absorção de Ca devido ao ambiente, porque aves em conforto térmico teriam menos necessidade de absorver grandes quantidades de Ca. Moraes *et al.* (2021) também observaram menor positividade de calbindin-D28K no epitélio duodenal em codornas mantidas em temperaturas termoneutras. Como já mencionado, o ETC pode afetar negativamente o desempenho de postura das aves, devido à redução do CR (Bilal *et al.*, 2021) e da utilização de nutrientes, levando a menor produção, qualidade e espessura da casca dos ovos (Vercese *et al.*, 2012; Attia *et al.*, 2016). O ETC também pode influenciar na redução da presença de calbindin-D28k no duodeno, íleo, ceco, cólon e útero de aves, causando deterioração na qualidade da casca dos ovos (Ebeid *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2021). No presente estudo, o mesmo efeito também foi observado no jejuno de aves submetidas a temperaturas de 36°C.

3.7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a suplementação de fitase traz benefícios às aves, especialmente para aquelas mantidas em temperaturas de 30°C, dada a maior demanda por vitaminas e minerais, devido às alterações em seu metabolismo. A fitase melhorou a eficiência da absorção de Ca e influenciou positivamente a maior

expressão de anti-calbindin-D28K no duodeno e jejuno das aves. Isso proporcionou maior mobilização de Ca para as tíbias e maior produção total de ovos para as aves mantidas nessa temperatura. Além disso, os resultados demonstraram que a suplementação dietética de fitase a 1500 FTU foi capaz de não apenas minimizar os efeitos deletérios do estresse térmico (36°C), mas também aumentou a espessura da casca (melhor qualidade dos ovos). Essas melhorias contribuem significativamente para garantir a integridade dos ovos, promovendo maior durabilidade e proteção durante as fases de manuseio, armazenamento e transporte. Nossos resultados sugerem que isso é melhor alcançado com 1500 FTU de fitase quando codornas japonesas são expostas a altas temperaturas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.E. Quantitative computed tomography. **European Journal of Radiology**, 71, 415-424, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.04.074>.
- ALAGAWANY, M.; FARAG, M.R.; ABD EL-HACK, M.E.; PATRA, A. Heat stress: effects on productive and reproductive performance of quail. **World's Poultry Science Journal**, 73, 747-756, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000782>.
- ATTIA, Y.A.; EL-HAMID, A.E.E.A.; ABEDALLA, A.A.; BERIKA, M.A.; AL-HARTHI, M.A.; KUCUK, O.; SAHIN, K.; ABOU-SHEHEMA, B.M. Laying performance, digestibility and plasma hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin C, and/or vitamin E supplementation. **SpringerPlus**, 5, 1619, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3304-0>.
- BAGHBAN-KANANI, P.; HOSSEINTABAR-GHASEMABAD, B.; AZIMI-YOUVALARI, S.; SEIDAVI, A.; LAUDADIO, V.; MAZZEI, D.; TUFARELLI, V. Effect of dietary sesame (*Sesame indicum* L) seed meal level supplemented with lysine and phytase on performance traits and antioxidant status of late-phase laying hens. **Asian–Australasian Journal of Animal Sciences**, 33, 277–285, 2020. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0107>.
- BAR, A. Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151, 477-490, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.006>.
- BEGGS, M.R.; ALEXANDER, R.T. Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, 242, 840-849, 2017. <https://doi.org/10.1177/1535370217699536>.
- BERNARDES, R.D.; OLIVEIRA, C.H.; CALDERANO, A.A.; FERREIRA, R.S.; DIAS, K.M.M.; ALMEIDA, B.F.; ALEIXO, P.E.; ALBINO, L.F.T. Effect of phytase and protease combination on performance, metabolizable energy, and amino acid digestibility of broilers fed nutrient-restricted diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 51, e20210211, 2022. <https://doi.org/10.37496/rbz5120210211>.
- BILAL, R.M.; HASSAN, F.; FARAG, M.R.; NASIR, T.A.; RAGNI, M.; MAHGOUB, H.A.M.; ALAGAWANY, M. Thermal stress and high stocking densities in poultry farms: Potential effects and mitigation strategies. **Journal of Thermal Biology**, 99, 102944, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102944>.
- BROCH, J.; SAVARIS, V.D.L.; WACHHOLZ, L.; CIRILO, E.H.; TESSER, G.L.S.; PACHECO, W.J.; EYNG, C.; PESTI, G.M.; NUNES, R.V. Influence of phytate and phytase on performance, bone, and blood parameters of broilers at 42 days old. **South African Journal of Animal Science**, 51, 2, 2021. <https://doi.org/10.4314/sajas.v51i2.3>.
- CHALMERS, H.J.; DYKES, N.L.; LUST, G.; FARESE, J.P.; BURTON-WURSTER, N.I.; WILLIAMS, A.J.; TODHUNTER, R.J. Assessment of bone mineral density of the

femoral head in dogs with early osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, 67, 796-800, 2006. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.5.796>.

CORRADINO, R.A.; SMITH, C.A.; KROOK, L.P.; FULLMER, C.S. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. **Endocrinology**, 132, 193–8, 1993. <https://doi.org/10.1210/endo.132.1.8419123>.

COWIESON, A.J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M.R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World's Poultry Science Journal**, 67, 225-236, 2011. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000250>.

DALLMANN, H.M.; AVILA, V.S.; KRABBE, E.L.; SUREK, D.; BEDENDO, G.C.; TOLEDO, T.S.; DALLMANN, P.R.; ROLL, A.A.P.; ROLL, V.F.B.; RUTZ, F. Different phytase levels and energy densities in broiler diets on performance, nutrient digestibility, and bone integrity from 28 to 35 days of age. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 75, 280-292, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12790>.

DANG, D.X.; CHUN, S.G.; KIM, I.H. Feeding broiler chicks with *Schizosaccharomyces pombe*-expressed phytase-containing diet improves growth performance, phosphorus digestibility, toe ash, and footpad lesions. **Animal Bioscience**, 35, 1390–1399, 2022. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0462>.

DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95, 878-896, 2014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6998>.

DERSJANT-LI, Y.; EVANS, C.; KUMAR, A. Effect of phytase dose and reduction in dietary calcium on performance, nutrient digestibility, bone ash and mineralization in broilers fed corn-soybean meal-based diets with reduced nutrient density. **Animal Feed Science and Technology**, 242, 95-110, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.05.013>.

EBEID, T.A.; SUZUKI, T.; SUGIYAMA, T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. **Poultry Science**, 91, 2282-2287, 2012. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01898>.

FARIAS, M.R.S.; LEITE, S.C.B.; SILVA, H.P.; PACHECO, D.B.; ALVES, G.C.; ABREU, C.G.; FREITAS, E.R. Superdosing Phytases in the Diets of Light Laying Hens: Productive Performance and Bone Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 23, 03, 2021. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1395>.

FISININ, V.I.; KAVTARASHVILI, A.S.H. Heat stress in poultry. I. Danger, related physiological changes and symptoms (review). **Agricultural Biology**, 50, 162–171, 2015. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.2.162eng>.

FRANZINI, B.D.; CRUZ, L.C.F.; SAMPAIO, S.A.; BORGES, K.F.; BARROS, H.S.S.; SANTANA, F.X.C.; GOUVEIA, A.B.V.S.; PAULO, L.M.; MINAFRA, C.S. Blood hematological and hormonal indicators of stress in poultry. **Research, Society and Development**, 11, e16111326303, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26303>.

GAUTIER, A.E.; WALK, C.L.; DILGER, R.N. Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol. **Poultry Science**, 97, 211-218, 2018. <https://doi.org/10.3382/ps/pex291>.

HIRVONEN, J.; LILJAVIRTA, J.; SAARINEN, M.T.; LEHTINEN, M.J.; AHONEN, I.; NURMINEN, P.I. Effect of Phytase on in Vitro Hydrolysis of Phytate and the Formation of myo-Inositol Phosphate Esters in Various Feed Materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, 11396–11402, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03919>.

HOSSEINI-VASHAN, S.J.; GOLIAN, A.; YAGHOBFAR, A. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. **International Journal of Biometeorology**, 60, 1183–92, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1112-9>.

JANKOWSKI, J.; MIKULSKI, D.; TATARA, M.R.; KRUPSKI, W. Effects of increased stocking density and heat stress on growth, performance, carcass characteristics and skeletal properties in turkeys. **Veterinary Record**, 176, 21, 2015. <https://doi.org/10.1136/vr.102216>.

KOELKEBECK, K.W.; HARRISON, P.C.; MADINDOU, T. Effect of carbonated drinking water on production performance and bone characteristics of laying hens exposed to high environmental temperatures. **Poultry Science**, 72, 1800-1803, 1993. <https://doi.org/10.3382/ps.0721800>.

LEE, S.A.; NAGALAKSHMI, D.; RAJU, M.V.L.N.; RAO, S.V.R.; BEDFORD, M.R.; WALK, C.L. Phytase as an alleviator of high-temperature stress in broilers fed adequate and low dietary calcium. **Poultry Science**, 98, 2122–2132, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pey566>.

MANOBHAVAN, M.; ELANGO VAN, A.V.; SRIDHAR, M.; SHET, D.; AJITH, S.; PAL, D.T.; GOWDA, N.K.S. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn–soyabased diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 100, 93–100, 2016. <https://doi.org/10.1111/jpn.12341>.

MARTÍNEZ-VALLESPÍN, B.; MÄNNER, K.; ADER, P.; ZENTEK, J. Evaluation of High Doses of Phytase in a Low-Phosphorus Diet in Comparison to a Phytate-Free Diet on Performance, Apparent Ileal Digestibility of Nutrients, Bone Mineralization, Intestinal Morphology, and Immune Traits in 21-Day-Old Broiler Chickens. **Animals (Basel)**, 12, 1955, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12151955>.

MORAES, L.R.; DELICATO, M.E.A.; CRUZ, A.S.; SILVA, H.T.F.N.P.; ALVES, C.V.B.V.; CAMPOS, D.B.; SARAIVA, E.P.; COSTA, F.P.; GUERRA, R.R. Methionine

supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. **Plos One**, 16, e0245615, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245615>.

NYS, Y.; ROY, N.L. Calcium Homeostasis and Eggshell Biomineralization in Female Chicken. **Vitamin D (Fourth Edition)**, 1, 361-382, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00022-7>.

OLIVEIRA, J.F.; ROSSI JÚNIOR, J.L.; LEITE, F.L.G.; OLIVEIRA, D.C.; COSTA, L.A.V.S.; SILVA, I.C.C.; TEIXEIRA, M.W.; COSTA, F.S. Densitometria da vértebra dorsal, osso pleural e osso neural em tartarugas verdes híidas por tomografia computadorizada quantitativa. **Ciência Rural**, 42,1440–1445, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103 84782012000800018>.

PIENIAZEK, J.; SMITH, K.A.; WILLIAMS, M.P.; MANANGI, M.K.; VAZQUEZANON, M.; SOLBAK, A.; MILLER, M.; LEE, J.T. Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. **Poultry Science**, 96, 370-382, 2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pew225>.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M.R.; ACAMOVIC, T.; MARES, P.; ALLYMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. **British Poultry Science**, 52, 245-254, 2011. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.560596>.

PORTO, M.L.; TEÓFILO, T.S.; CAVALCANTI, D.M.L.P.; FREITAS, C.I.A.; OLIVEIRA, M.F.; FONTENELE-NETO, J.D. Incubation variables, performance, and morphometry of the duodenal mucosa of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) submitted to different incubation temperatures and thermally challenged after hatching. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 73, 495-507, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12052>.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing (Version 4.2.0). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022. URL: Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acessado em: 2 Abr. 2024.

RANGANA, S. 'Manual of analysis of fruit and vegetable products.' 1979. 634 pp. (Tata McGraw Hill).

ROJAS, I.Y.M.; GONZÁLEZ, E.A.; MENOCAL, J.A.; SANTOS, T.T.; ARGUELLO, J.R.; COELLO, C.L. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum–soybean-meal-based diets. **Journal of Applied Animal Research**, 46, 314–321, 2017. <https://doi.org/10.1080/ 09712119.2017.1299740>.

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.; DE OLIVEIRA, R.F.; DE TOLEDO BARRETO, S.L.; BRITO, C.O. (2017) 'Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.' 4th edn (UFV: Viçosa, Brazil). 2017. 488p. Disponível em:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4532766/mod_resource/content/1/Rostagno%20et%20al%202017.pdf. Acessado em: 28 abril. 2024.

ROSTAGNO, M.H. Effects of heat stress on the gut health of poultry. **Journal of Animal Science**, 98, skaa090, 2020. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa090>

SAHIN, N.; BALCI, T.A.; KUCUK, O.; SMITH, M.O.; SAHIN, K. Effects of 25-hydroxycholecalciferol and soy isoflavones supplementation on bone mineralisation of quail. **British Poultry Science**, 50, 709–715, 2009. <https://doi.org/10.1080/00071660903261944>.

SAMPATH, V.; GAO, S.; PARK, J.H.; KIM, I.H. Exogenous phytase improves growth performance, nutrient retention, tibia mineralization, and breast meat quality in ross-308 broilers. **Agriculture**, 13, 1906, 2023. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101906>.

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**, 7, e06081, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021. e06081>.

SEEDOR, J.G.; QUARTUCCIO, H.A.; THOMPSON, D.D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, 6, 339–346, 1991. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650060405>.

SENS, R.F.; BASSI, L.S.; ALMEIDA, L.M.; ROSSO, D.F.; TEIXEIRA, L.V.; MAIORKA, A. Effect of different doses of phytase and protein content of soybean meal on growth performance, nutrient digestibility, and bone characteristics of broilers. **Poultry Science**, 100, 100917, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.015>.

SHARMA, N.K.; CHOCT, M.; WU, S.B.; SMILLIE, R.; MORGAN, N.; OMAR, A.S.; SHARMA, N.; SWICK, R.A. Performance, litter quality and gaseous odour emissions of broilers fed phytase supplemented diets. **Animal Nutrition**, 2, 288–295, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.10.003>.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos 3. ed. **Viçosa**, MG: UFV, 2006. 235 p.

SIMÕES DE SOUZA, J.C.; TAVARES FERNANDES, T.H.; DE ALBUQUERQUE BONELLI, M.; SÉLLOS COSTA, F. Quantitative computed tomography of healthy adult boas (boa constrictor). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 49, 1012–1015, 2018. <https://doi.org/10.1638/2017-0224.1>.

SILVA, R.M.; FURLAN, A.C.; TON, A.P.S.; MARTINS, E.N.; SCHERER, C.; MURAKAMI, A.E. Calcium and phosphorus requirements of finishing meat quail. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 1509–1524, 2009. <https://doi.org/10.1590/S151635982009000800015>

SILVA, V.C.; DE SOUSA NASCIMENTO, R.; LOPES NETO, J.P.; RIBERIO MIRANDA, J.; DE MELO LOPES, F.F.; FURTADO, D.A. Bioclimatic zoning for quails

in the dry period in the state of Paraíba, Brazil. **Revista Ceres**, 69, 125–130, 2022. <https://doi.org/10.1590/0034-737x202269020001>.

STAPANE, L.; ROY, N.L.; EZAGAL, J.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A.B.; LABAS, V.; COMBES-SOIA, L.; HINCKE, M.T.; GAUTRON, J. Avian eggshell formation reveals a new paradigm for vertebrate mineralization via vesicular amorphous calcium carbonate. **Journal of Biological Chemistry**, 295, 15853-15869, 2020. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014542>.

SUGIYAMA, T.; KIKUCHI, H.; HIYAMA, S.; NISHIZAWA, K.; KUSUHARA, S. Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. **British Poultry Science**, 48, 233-238, 2007. <https://doi.org/10.1080/00071660701302270>.

TRUONG, L.; MILLER, M.R.; SAINZ, R.D.; KING, A.J. Changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) blood gases and electrolytes in response to multigenerational heat stress. **Plos Climate**, 2, e0000144, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000144>

VERCESE, F.; GARCIA, E.A.; SARTORI, J.R.; SILVA, A.P.; FAITARONE, A.B.G.; BERTO, D.A.; MOLINO, A.B.; PELÍCIA, K. Performance and egg quality of Japanese quails submitted to cyclic heat stress. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 14, 37-41, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2012000100007>.

WANG, X.; LI, P.; ZHAO, J.; JIAO, H.; LIN, H. The temporal gene expression profiles of calcium and phosphorus transporters in Hy-Line Brown layers. **Poultry Science**, 101, 101736, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101736>.

WASTI, S.; SAH, N.; MISHRA, B. Impact of Heat Stress on Poultry Health and Performances, and Potential Mitigation Strategies. **Animals**, 10, 1266, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10081266>.

WU, J.C.Y.; SMITH, M.W.; MITCHELL, M.A.; PEACOCK, M.A.; TURVEY, A.; KEABLE, S.J. Enterocyte expression of calbindin, calbindin mRNA and calcium transport increases in jejunal tissue during onset of egg production in the fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 106, 263–269, 1993. [https://doi.org/10.1016/03009629\(93\)90510-B](https://doi.org/10.1016/03009629(93)90510-B).

YAN, F.; KEEN, C.A.; ZHANG, K.Y.; WALDROUP, P.W. Comparison of Methods to Evaluate Bone Mineralization. **Journal of Applied Poultry Research**, 14, 492-498, 2005. <https://doi.org/10.1093/japr/14.3.492>.

YAN, F.F.; MOHAMMED, A.A.; MURUGESAN, G.R.; CHENG, H.W. Effects of a dietary synbiotic inclusion on bone health in broilers subjected to cyclic heat stress episodes. **Poultry Science**, 98, 1083–9, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pey508>.

ZHANG, Y.N.; WANG, S.; LI, K.C.; RUAN, D.; CHEN, W.; XIA, W.G.; WANG, S.L.; ABOUELEZZ, K.F.M.; ZHENG, C.T. Estimation of dietary zinc requirement for laying duck breeders: effects on productive and reproductive performance, egg quality, tibial

characteristics, plasma biochemical and antioxidant indices, and zinc deposition. **Poultry Science**, 99, 454-462, 2020. <https://doi.org/10.3382/ps/pez530>.

ZHANG, H.; MAJDEDDIN, M.; GAUBLOMME, D.; TAMINIAU, B.; BOONE, M.; ELEWAUT, D.; DAUBE, G.; JOSIPOVIC, I.; ZHANG, K.; MICHIELS, J. 25-hydroxycholecalciferol reverses heat induced alterations in bone quality in finisher broilers associated with effects on intestinal integrity and inflammation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 12, 104, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00627-6>.

4 CAPÍTULO III – EXPRESSÃO GÊNICA DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6 EM CODORNAS JAPONESAS (*COTURNIX JAPONICA*) SUBMETIDAS A SUPERDOSAGEM DE FITASE E SOB DIFERENTES TEMPERATURAS.³

4.1 RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da superdosagem de fitase na dieta de codornas poedeiras submetidas a diferentes temperaturas, avaliando seu desempenho, bioquímica do sangue e expressão gênica dos transportadores epitelial de cálcio Calbindin-D28K e TRPV6. Setecentos e vinte (720) codornas japonesas em fase de produção foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×3 , com cinco níveis de suplementação de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU/kg) e três temperaturas (24°C, 30°C e 36°C), totalizando 15 tratamentos e seis repetições de oito aves cada. O estudo teve início na 8ª semana de idade e continuou por dois ciclos de 21 dias, totalizando 42 dias de experimento. Foram mensurados os parâmetros de desempenho, bioquímica sérica e expressão gênica de calbindin-D28K e TRPV6 através de PCR real-time. Os dados foram submetidos às análises de variância, Tukey e regressão. Aves mantidas a 36°C, apresentaram menor consumo de ração do que aquelas em 24 e 30°C. A 30°C, as aves apresentaram menores níveis séricos de ácido úrico do que as aves a 36°C, e uma maior produção total de ovos, massa dos ovos e expressão gênica de Calbindin-D28K no útero do que aquelas a 24 e 36°C. Aves mantidas em 24°C apresentaram maiores níveis séricos de cálcio e fósforo do que aquelas mantidas em 30 e 36°C. Em um nível de suplementação de 1500 FTU, a fitase proporcionou maior espessura da casca do ovo em codornas mantidas em 36°C e maior expressão gênica de calbindin-D28K no rim. Portanto, recomenda-se o uso de 1500 FTU de fitase para codornas japonesas expostas a altas temperaturas, uma vez que a superdosagem de fitase demonstrou ser eficaz em mitigar os efeitos negativos do estresse térmico.

Palavras-chave: calbindina-D28K; transportadores de cálcio; estresse térmico; suplementação com fitase; TRPV6.

³ Artigo publicado na revista Poultry Science (Anexo C)

4.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of phytase super-dosing in the diet of laying quails subjected to different temperatures, their performance, blood biochemistry, and gene expression of the epithelial calcium transporters Calbindin-D28K and TRPV6. Seven hundred and twenty (720) Japanese quails in the production phase were distributed in a completely randomized design, in a 5×3 factorial scheme, with five levels of phytase supplementation (0, 500, 1000, 1500 and 3000 FTU/kg) and three temperatures (24°C, 30°C and 36°C), totaling 15 treatments, and six replicates of eight birds each. The study began at 8 weeks of age and continued for two 21-day cycles, totaling 42 days of experiment. Performance parameters, serum biochemistry, and gene expression of calbindin-D28K and TRPV6 were measured through real-time PCR. The data were subjected to analysis of variance, Tukey, and regression. Birds kept at 36°C showed lower feed intake than those kept at 24°C and 30°C. At 30°C, birds had lower serum uric acid levels than birds at 36°C, and higher total egg production, egg mass, and Calbindin-D28K gene expression in the uterus than those at 24°C and 36°C. Birds kept at 24°C had higher serum calcium and phosphorus levels than those kept at 30°C and 36°C. At a supplementation level of 1500 FTU, phytase provided greater eggshell thickness in quails kept at 36°C and greater calbindin-D28K gene expression in the kidney. Therefore, the use of 1500 FTU of phytase is recommended for Japanese quail exposed to high temperatures, since phytase overdosage has been shown to be effective in mitigating the negative effects of heat stress.

Keywords: calbindin-D28K, calcium transporters, heat stress, phytase supplementation, TRPV6.

4.3 INTRODUÇÃO

Nos climas tropicais, amplamente presentes em grande parte do território brasileiro, as aves poedeiras enfrentam desafios significativos que prejudicam seu desempenho (Silva *et al.*, 2022). As elevadas temperaturas têm exercido um impacto adverso nos índices zootécnicos das aves, resultando não apenas em aumento na taxa de mortalidade, mas também afetando negativamente os resultados produtivos e econômicos na indústria avícola (Franzini *et al.*, 2022). Essa condição é especialmente evidente na criação de codornas poedeiras (*Coturnix japonica*), onde a qualidade da casca do ovo é prejudicada devido à restrição de cálcio, a qual é negativamente impactada pelo aumento da temperatura (Ebeid *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2021).

O cálcio é predominantemente adquirido por meio da absorção intestinal, assim como pela reabsorção óssea e renal (Beggs e Alexander, 2017). Esses processos envolvem a transferência eficiente do cálcio do sangue para o útero, com a assistência de dois transportadores essenciais de cálcio no epitélio, denominados transient receptor potential vanilloid channel type 6 (TRPV6) e Calbindin-D28k. Tais transportadores desempenham um papel crucial ao facilitar a mobilização do cálcio através das células intestinais (Moraes *et al.*, 2021).

Aves quando expostas a condições de estresse térmico devido as altas temperaturas, apresentam modificações fisiológicas e comportamentais. Essas alterações têm um impacto pronunciado na ingestão de alimentos e resultam em mudanças estruturais no epitélio intestinal, prejudicando a digestibilidade e absorção de nutrientes (Rostagno, 2020). Além disso, é importante considerar os efeitos adversos dos fatores anti-nutricionais, como o fitato. Este composto não apenas torna o fósforo e o cálcio indisponível, mas também exerce influência negativa na digestão e absorção de outros minerais e aminoácidos, além de afetar a eficiência energética das dietas (Babatunde *et al.*, 2019; Bernardes *et al.*, 2022; Dallmann *et al.*, 2023). Esses dois fatores combinados agravam os desafios enfrentados pela produção avícola tropical, afetando a saúde e o desempenho das aves poedeiras.

A fitase (*myo*-inositol hexafosfato fosfoidrolase) pertence a uma classe de enzimas exógenas que tem como função degradar a molécula do fitato (*inositol hexaphosphate*, *IP6*) presente nos ingredientes das dietas, liberando fósforo, cálcio e demais nutrientes para serem utilizados pelos animais (Hirvonen *et al.*, 2019; Sena *et*

al., 2020). A utilização de quantidades de fitase superiores às usuais é denominada superdosagem, e tem atraído a atenção de pesquisadores, uma vez que sua administração possibilita uma degradação mais rápida e eficaz sobre a molécula do fitato presente nas dietas, resultando na subsequente liberação de minerais e demais nutrientes (Farias *et al.*, 2021).

Estudos tem demonstrado os efeitos benéficos da utilização de superdosagem de fitase no desempenho animal (Pirgozliev *et al.*, 2011; Pieniazek *et al.*, 2017; Farias *et al.*, 2021; Martínez-Vallespín *et al.*, 2022), na qualidade dos ovos, principalmente das cascas (Rojas *et al.*, 2017; Farias *et al.*, 2021), e nas características ósseas (Manobhavan *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016). Vale ressaltar que esses estudos foram realizados com frangos de corte e galinhas poedeiras, tornando imprescindível estudos avaliando os efeitos de uma superdosagem de fitase em codornas poedeiras submetidas a temperaturas elevadas. Neste aspecto, objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos de uma superdosagem de fitase sobre os parâmetros de desempenho produtivo, bioquímica sérica e expressão gênica dos transportadores de cálcio Calbindin-D28k e TRPV6 em codornas poedeiras submetidas a condições termoneutras e estresse térmico por calor.

4.4 MATERIAL E METODOS

4.4.1 Local Experimental e Comitê de Ética

O experimento foi conduzido nas câmaras climáticas pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba. O projeto teve aprovação ética do Comitê de Uso e Cuidado de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, sob o protocolo (processo de nº 3695120121). A eutanásia foi realizada por eletronarcole de acordo com as diretrizes do CEUA da referida instituição.

4.4.2 Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizadas 720 codornas japonesas em fase de produção a partir da oitava semana de vida, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x3, sendo cinco níveis de fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000FTU) e três faixas de temperatura (24, 30 e 36°C), com 6 repetições de 8 aves cada (48

animais por tratamento), representando faixas termoneutras (24°C) e de estresse térmico (30 e 36°C), totalizando quinze tratamentos. As codornas iniciaram os tratamentos com oito semanas de idade e permaneceram por dois ciclos de 21 dias, totalizando 42 dias de experimento.

4.4.3 Alojamento

As aves foram alojadas em 3 câmaras climáticas com dimensões (19,71 m²), cada câmara foi equipada com 30 gaiolas metálicas (55 x 35 x 27cm) com 01 bebedouro tipo nipple e 01 comedouro tipo calha por gaiola. As câmaras contaram com sistema de ar-condicionado, aquecedor, umidificador, desumidificador, exaustor, termostatos e sistema de iluminação. O dimensionamento de aves/gaiola foi de 481,25cm²/ave. O programa de luz fornecido foi o de 17 horas de luz (Luz artificial) durante todo o período experimental.

4.4.4 Dietas e tratamentos experimentais

As dietas foram formuladas segundo recomendação das Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (Rostagno *et al.* 2017), variando apenas a suplementação de fitase. Todas as dietas foram formuladas considerando o que a matriz da enzima disponibiliza com 500FTU (0,165% Ca - 0,150% P) (Tabela 9).

A fitase adicionada às dietas experimentais foi derivada de *Escherichia coli* (*E. coli*), produzida por *Thricoderma reesei* (Quantum Blue, AB Vista, Marlborough, Reino Unido), substituindo parte do ingrediente inerte nas dietas.

Os tratamentos consistiram em cinco dietas à base de milho e farelo de soja, fornecidas em cada câmara climática (24, 30 e 36°C). T1: Tratamento 1 (0FTU) consistiu em uma dieta controle negativo, sem suplementação de fitase e com concentrações reduzidas de cálcio e fósforo. T2: Tratamento 2 (500FTU) foi uma dieta balanceada com adição de fitase, seguindo as recomendações da matriz nutricional de fitase para cálcio e fósforo. Os demais tratamentos (T3 - 1000FTU; T4 - 1500FTU; T5 - 3000FTU) continham uma superdosagem de fitase. As concentrações de fitase foram alcançadas adicionando fitase para substituir o material inerte, considerando as

concentrações da dieta controle negativo. As aves tiveram acesso à água e à ração *ad libitum* durante todo o período experimental.

Tabela 9. Dietas experimentais, contendo cinco níveis de Fitase (0, 500, 1000, 1500 e 3000 FTU), levando em consideração a matriz de 500 FTU da enzima, para codornas japonesas na fase de postura.

Tratamentos		T1	T2	T3	T4	T5
Ingredientes	Unidade	0FTU	500FTU	1000FTU	1500FTU	3000FTU
Milho Grão - 7,88%	g/kg	597	597	597	597	597
Soja Farelo 45,22%	g/kg	305	305	305	305	305
Óleo de Soja	g/kg	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67
DL- Metionina	g/kg	3,98	3,98	3,98	3,98	3,98
L-Lisina HCl	g/kg	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
L-Treonina	g/kg	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcário	g/kg	74,37	74,37	74,37	74,37	74,37
Fosfato Bicálcico 18,5%	g/kg	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal Comum	g/kg	3,45	3,45	3,45	3,45	3,45
Premix Mineral ¹	g/kg	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix Vitaminico ²	g/kg	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Colina	g/kg	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Antioxidante	g/kg	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Inerte ³	g/kg	0,60	0,50	0,40	0,30	0,00
Fitase ⁴	g/kg	0,00	0,10	0,20	0,30	0,60
Total		1000	1000	1000	1000	1000
Nutrientes		Unidade				
Fitase	FTU/kg	0	500	1000	1500	3000
Energia Metabolizável	kcal/kg	2800	2800	2800	2800	2800
Proteína Bruta	g/kg	190,00	190,00	190,00	190,00	190,00
Cálcio	g/kg	29,93	29,93	29,93	29,93	29,93
Fósforo Total	g/kg	3,94	3,94	3,94	3,94	3,94
Fósforo Disponível	g/kg	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77
Potássio	g/kg	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32
Sódio	g/kg	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55
Cloro	g/kg	3,19	3,19	3,19	3,19	3,19
Número de Mogin	mEq/kg	164,59	164,59	164,59	164,59	164,59
Aminoácidos Digestíveis (%)						
Metionina Digestível	g/kg	6,47	6,47	6,47	6,47	6,47
Metio + Cist Digestível	g/kg	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
Lisina Digestível	g/kg	11,07	11,07	11,07	11,07	11,07
Treonina Digestível	g/kg	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75
Triptofano Digestível	g/kg	2,07	2,07	2,07	2,07	2,07
Valina Digestível	g/kg	7,98	7,98	7,98	7,98	7,98

Os tratamentos acima expostos foram submetidos a três temperaturas diferentes (24, 30 e 36°C).

¹ Premix Mineral (concentração/kg de produto): Mn - 60 g, Fe - 80 g, Zn - 50 g, Cu - 10 g, Co - 2 g, I - 1 g e Se - 250 mg. ² Premix Vitaminico (concentração/kg de produto): Vit. A - 15 mil UI, Vit. D3 - 1,500,000 UI, Vit. E - 15000; Vit. B1 - 2.0 g, Vit. B2 - 4.0 g, Vit. B6 - 3.0 g, Vit. B12 - 0.015 g, ácido nicotínico - 25 g, ácido pantotênico - 10 g; Vit. K3 - 3.0 g, ácido fólico - 1.0 g. ³ Inerte = Caulim. ⁴ Enzima fitase = 100 gramas/tonelada fornece 500 FTUs/kg de ração.

4.4.5 Avaliação do desempenho produtivo

Foram avaliados os parâmetros de consumo de ração (CR - g/ave/dia), produção total de ovos (PTO - %), peso do ovo (PO - g), massa do ovo (MO - g/ave/dia) e espessura da casca do ovo (EC - mm). O período de avaliação de desempenho foi dividido em dois ciclos de 21 dias. Ao final de cada período foram coletadas as sobras das rações de cada parcela para o cálculo do consumo de ração.

O consumo de ração (CR) foi determinado dividindo-se a diferença entre a ração fornecida durante a fase por tratamento e a sobra de ração pesada no final da fase pelo número de aves na parcela. As médias foram totalizadas para resultar no CR médio por ave na parcela (g/ave/dia).

A coleta dos ovos foi realizada duas vezes ao dia (8:00 e 15:00 horas) e anotadas em ficha de frequência de postura e mortalidade para correção dos dados. A produção de ovos em porcentagem foi obtida coletando-se diariamente o número de ovos produzidos, corrigindo sempre pela mortalidade, de forma que a relação de ovos íntegros produzidos foi expressa em porcentagem para cada tratamento, sobre a média de aves do período (%/ave/dia), correspondendo à produção de ovos comercializáveis.

Todos os ovos íntegros produzidos nos últimos três dias de cada ciclo de produção foram pesados individualmente com o auxílio de uma balança analítica (0,001g) para a obtenção do peso médio dos ovos, que por sua vez, foi multiplicado pelo número total de ovos produzidos no período experimental, obtendo-se assim a massa total de ovos. Esta massa foi dividida pelo número total de aves por dia, sendo expressa em gramas de g/ave/dia.

Ao final de cada ciclo de produção foram selecionados quatro ovos por parcela experimental, onde estes foram quebrados no meio (região equatorial), lavados e encaminhados para secagem em estufa de 55°C por um período de 24 horas. Posteriormente foi analisado a espessura de casca dos ovos (EC), sendo a mesma determinada com o auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo, resolução 0,001 mm) na linha mediana do ovo.

4.4.6 Bioquímica sérica do sangue

Para as coletas de bioquímica, as aves passaram por um jejum prévio de 6 horas, posteriormente foram coletados 4 ml de sangue de 1 ave por parcela experimental, por meio da punção da veia jugular com auxílio de agulha de 13 x 0,4 mm, o sangue foi armazenado em tubo seco com ativador de coagulo (BD Vacuteiner® Seco), que após 30 minutos de repouso foram centrifugadas a 3.500 rpm em centrífuga (SL-702/RAF30, Solab) durante 1 minuto para obtenção do soro, que posteriormente foram armazenados em Tubos de Ependorfs – 2 ml e congelados para posterior análise.

Os níveis séricos de gama glutamil transferase (Kit Bioclin, Referência k080-2), fosfatase alcalina (Kit Bioclin, Referência k224-2), Fósforo (Kit Bioclin, Referência #K020-1), Cálcio (Kit Bioclin, Referência #K051-2), Creatinoquinase (CK) (Kit Bioclin, Referência #K010-1.1) e ácido úrico (Kit Bioclin, Referência k139-2), foram analisados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal. Para as análises foi utilizado o equipamento analisador para bioquímica clínica respons®920 - DiaSys Diagnostic Systems GmbH - Alemanha, que utiliza a Colorimetria e Ensaio imunoturbidimétrico.

4.4.7 Coleta de órgãos

Ao final do 2º ciclo de produção, 6 aves por tratamento foram escolhidas aleatoriamente e eutanasiadas por eletronarcose, para a coleta de órgãos: intestino delgado (Duodeno, Jejuno) rim e útero, para as análises de PCR em tempo real (qPCR) para o transportador de cálcio Calbindin-D28k. Além disso, os rins coletados também foram utilizados para a análise de expressão de TRPV6.

4.4.8 PCR em tempo real (qPCR) para Calbindin-D28k e TRPV6

Amostras de tecidos de duodeno, jejuno, rim e útero foram coletadas de 6 animais selecionados aleatoriamente em cada tratamento. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e depois transferidas para um ultrafreezer a -80°C até o processamento. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise e a extração de RNA foi realizada usando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega). A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas pelas razões de absorbância 260/280 e 260/230 obtidas utilizando um

espectrofotômetro (Colibri Microvolume Spectrometer, Titertek Berthold). A transcrição reversa foi realizada utilizando o GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) (Promega) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

A expressão de genes selecionados foi acessada usando um sistema Stratagene Mx3005P qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) (Agilent Technologies). Os oligonucleotídeos foram obtidos de sequências de codornas japonesas publicadas anteriormente e a *HMBS* foi utilizada como controle endógeno (Tabela 10). As reações de PCR foram realizadas utilizando Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix low ROX (Agilent Technologies). As condições de amplificação foram 3 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C; 1 minuto a 95°; 30 segundos a 55° e finalmente 30 segundos a 95°C.

Tabela 10. Sequência de oligonucleotídeos usados para o PCR quantitativo.

Genes	qPCR Primers (5'-3')	Número do GenBank	Tamanho do Produto
<i>CALBINDIN28</i>	>GACGGCAATGGGTACATGGA <TCGGGTGTTAAGTCCAAGCC	XM_015855985.1	98 bp
<i>TRPV6</i>	>CCATCATTGCCACCCTCCTT <AGCAACAATCTGGGCTCTCC	XM_015873874.1	107 bp
<i>HMBS</i>	>TGACCTGGTAGTTCACTCCTT <TTGCAAATAGCACCAATGGTAAAG	XM_015872688.2	123 bp
> = forward; < = reverse			

A análise da curva de dissociação permitiu avaliar a especificidade do primer. As amostras foram analisadas em duplicata e a quantificação relativa (gene alvo/controle endógeno) determinou sua expressão. Os dados foram normalizados para uma amostra de calibrador usando o método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001) com correção para eficiência de amplificação.

4.4.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) utilizando o software estatístico R versão 4.2.0 (R Core Team, 2022), para determinar os efeitos dos diferentes níveis de fitase e faixas de temperatura sobre as variáveis analisadas. Para as variáveis que apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), foi realizado

o teste de Tukey para comparar as médias entre as diferentes temperaturas. Além disso, foi empregada a análise de regressão para identificar o nível ótimo de fitase.

As variáveis foram analisadas de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

Onde:

- Y_{ijkl} = variável resposta
- μ = média geral
- α_i = efeito do i-ésimo nível de fitase
- β_j = efeito da j-ésima faixa de temperatura
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = efeito de interação entre o i-ésimo nível de fitase e a j-ésima faixa de temperatura
- ϵ_{ijkl} = termo de erro aleatório associado a cada observação, assumido como normalmente distribuído com média zero e variância constante

Em caso de significância para os níveis de fitase, o seguinte modelo foi aplicado:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$$

Onde:

- Y_i = variável resposta para a i-ésima observação.
- β_0 = intercepto, representando o valor esperado de Y quando o nível de fitase é zero (nível de base).
- X_i = nível de fitase para a i-ésima observação.
- β_1 = inclinação, indicando o efeito de um aumento de uma unidade no nível de fitase sobre a variável resposta.
- ϵ_i = termo de erro aleatório para a i-ésima observação, assumido como normalmente distribuído com média zero e variância constante.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Desempenho

Nos resultados de consumo de ração (CR - g/ave/dia), produção total de ovos (PTO - %), peso do ovo (PO - g), massa do ovo (MO - g/ave/dia) e espessura da casca do ovo (EC - mm) (Tabela 11), podemos observar efeito significativo para consumo de ração, apenas entre as temperaturas analisadas ($p < 0,0001$). Nelas, os

animais submetidos em temperatura de 36°C tiveram um menor consumo de ração, quando comparados aos animais submetidos nas demais temperaturas (24 e 30°C).

Para a produção total de ovos ($p < 0,0001$) e massa de ovos ($p < 0,0001$), também notamos efeitos apenas dentre as temperaturas analisadas, destacando que animais submetidos em temperaturas de 30°C obtiveram maiores produção total e massa de ovos, quando comparados aos animais submetidos nas demais temperaturas (24 e 36°C).

Para a variável de EC podemos observar efeito significativo para interação entre os níveis de fitase vs temperatura ($P < 0,0001$) sobre a variável espessura de casca. Podemos observar que aves não suplementadas com fitase em temperaturas mais elevadas (30 e 36°C) possuem uma menor EC quando comparadas a aves em temperatura de conforto (24°C). Todavia, quando fornecido na dieta, a fitase proporcionou uma melhor EC principalmente para temperaturas mais elevadas (30 e 36°C), conseguindo até uma maior EC a um nível de 1500 FTU na temperatura de 36°C. Não sendo observado efeito significativo para as demais variáveis analisadas.

Tabela 11. Valores médios de consumo de ração (CR), produção total de ovos (PTO), peso dos ovos (PO), massa de ovos (MO) e espessura da casca (EC) de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperatura	Fitase	Temp x Fit	Regressão
CR, g/ave/dia	24	18,931	19,701	19,596	19,484	19,849	19,512a	7,737	<0,0001	0,3491	0,9608	NS
	30	19,705	19,978	20,309	19,997	19,407	19,879a					
	36	15,024	16,179	16,484	16,118	15,471	15,855b					
	Média	17,887	18,619	18,796	18,533	18,242						
PTO, %	24	66,013	66,749	68,071	70,074	65,365	67,254b	11,670	<0,0001	0,7607	0,9266	NS
	30	80,549	76,297	82,280	80,740	77,122	79,398a					
	36	66,379	64,943	64,313	61,510	62,570	63,943b					
	Média	70,980	69,330	71,555	70,775	68,352						
PO, g	24	10,560	11,109	11,058	10,875	11,103	10,941	17,034	0,3002	0,3903	0,3168	NS
	30	10,818	10,967	10,553	10,963	10,999	10,860					
	36	9,267	9,666	12,624	9,957	9,823	10,268					
	Média	10,215	10,581	11,412	10,599	10,642						
MO, g/ave/dia	24	6,955	7,413	7,519	7,619	7,241	7,349b	21,494	<0,0001	0,4463	0,7208	NS
	30	8,711	8,369	8,680	8,851	8,470	8,616a					
	36	6,209	6,288	8,297	6,129	6,170	6,619b					
	Média	7,292	7,357	8,165	7,533	7,294						
EC, mm	24	0,427a	0,406a	0,410a	0,404b	0,406a	0,411	3,6018	0,1180	0,0329	<0,0001	NS
	30	0,402b	0,395a	0,411a	0,399b	0,407a	0,403					
	36	0,387b	0,398a	0,394a	0,443a	0,412a	0,407					
	Média	0,405	0,399	0,405	0,415	0,408						

CV% = Coeficiente de variação; NS = Não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase, pelo teste de Tukey (p<0,05). Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

4.5.2 Bioquímica sérica

Para as variáveis Gama Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Creatina quinase (CK) e Ácido úrico (AU) (Tabela 12), podemos observar efeito para FA entre as temperaturas analisadas. Aves quando submetidas a temperaturas de 36°C apresentaram maiores valores para FA quando comparadas a 24 e 30°C ($p=0,01$). Também foi observado um efeito linear crescente (Tabela 14) para os níveis de FA ($p=0,0404$) à medida que se aumentava os níveis de fitase nas dietas (Tabela 14).

Os resultados obtidos para P e Ca, demonstraram efeito apenas nas temperaturas. Animais submetidos em temperaturas de 24°C apresentaram valores superiores para P e Ca quando comparadas as aves submetidas em temperaturas de 30 e 36°C.

Em relação a concentração de AU no sangue, notamos um impacto significativo ($P=0,01$) da interação entre temperaturas e concentração de fitase. Quando adicionada nas dietas das aves, a enzima fitase proporcionou uma semelhança nos valores de AU, exceto na temperatura de 30°C em um nível de 1000 FTU, onde os animais apresentaram menores valores de AU. Também foi observado efeito linear decrescente (Tabela 14) nas concentrações de AU ($P=0,0508$) em aves mantidas em temperaturas de 36°C à medida que aumentava os níveis de enzima nas dietas das aves.

Tabela 12. Gama Glutamil Transferase (GGT); Fosfatase Alcalina (FA); Fósforo (P); Cálcio (Ca); Creatina Quinase (CK); Ácido Úrico (AU) de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase e submetidas a diferentes temperaturas.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperatura	Fitase	Temp x Fit	Regressão
GGT (U/L)	24	0,37	1,38	3,34	5,22	0,58	2,18	25,89	0,84	0,28	0,60	NS
	30	0,67	4,12	1,10	0,37	0,66	1,38					
	36	0,67	7,30	1,10	0,52	0,41	1,99					
	Média	0,57	4,27	1,85	2,03	0,55						
FA (U/L)	24	260,6	303,8	262,7	260,0	303,9	278,2B	27,98	0,01	0,01	0,91	0,0404*
	30	199,1	300,5	212,1	223,8	321,7	251,5B					
	36	284,6	392,6	314,5	354,9	369,8	343,3A					
	Média	248,1	332,3	263,1	279,6	331,8						
P (mg/dl)	24	5,20	5,05	5,22	5,71	5,29	5,29A	19,38	0,01	0,82	0,83	NS
	30	4,61	4,54	4,38	4,16	4,84	4,50B					
	36	4,92	4,47	3,91	4,22	4,20	4,34B					
	Média	4,91	4,68	4,50	4,70	4,77						
Ca (mg/dl)	24	19,18	18,12	18,50	21,45	19,88	19,42A	12,00	0,02	0,19	0,17	NS
	30	18,73	16,05	17,62	19,01	16,34	17,55B					
	36	17,28	16,68	16,92	15,65	17,40	16,78B					
	Média	18,40	16,95	17,68	18,70	17,87						
CK (U/L)	24	770,7	564,4	748,6	539,4	660,5	656,7	26,61	0,94	0,05	0,37	NS
	30	741,6	740,2	748,3	485,1	674,2	677,9					
	36	521,2	683,2	755,7	567,6	799,6	665,5					
	Média	677,8	662,6	750,9	530,7	711,4	677,8					
AU (mg/dl)	24	3,49A	2,78A	3,99A	3,87A	3,24A	3,47	20,14	0,02	0,15	0,01	NS
	30	3,28A	2,75A	2,41B	3,14A	3,25A	2,97					NS
	36	4,04A	3,60A	3,93A	3,01A	3,23A	3,56					0,0508*
	Média	3,60	3,04	3,44	3,34	3,24						

CV% = Coeficiente de variação; NS = Não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Efeito linear (FA; $y = 0,0185x + 268,75$; $R^2: 0,2972$); * Efeito linear (AU; $y = -0,0003x + 3,8874$; $R^2: 0,4993$); Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

4.5.3 Expressão gênica de Calbindin-D28K e TRPV6

Os resultados da expressão gênica de Calbindin-D28K (Tabela 13) revelaram um efeito quadrático significativo ($P=0,0202$) das concentrações de fitase sobre a expressão do gene nos rins (Figura 10). Com o aumento da fitase na dieta, a expressão de Calbindin-D28K também aumentou, alcançando seu pico com 2500 FTU de fitase (Tabela 14). Não foi observado efeito das diferentes temperaturas analisadas.

A expressão de Calbindin-D28K no útero das codornas foi afetada apenas pelas diferentes temperaturas analisadas ($P=0,0013$). As aves expostas a estresse térmico severo (36°C) apresentaram menor expressão do gene em comparação com aquelas mantidas a 24°C e 30°C (Figura 11). Nos demais tecidos analisados, não foi observado efeito significativo na expressão do gene.

Em relação à expressão de TRPV6 nos rins das codornas (Tabela 15), não foi observado nenhum efeito significativo das temperaturas avaliadas, nem da interação ou regressão.

Tabela 13. Expressão gênica de Calbindin-D28K no duodeno, jejuno, rins e útero de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase e submetidas a diferentes temperaturas.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	<i>p-Value</i>			
		0	500	1000	1500	3000			Temperatura	Fitase	Temp x Fit	Regressão
Expressão												
Duodeno	24	0,53	0,55	0,32	0,56	0,46	0,48	15,90	0,4650	0,3016	0,8182	NS
	30	0,13	0,28	0,28	0,72	0,60	0,40					
	36	0,21	0,39	0,31	0,50	0,26	0,33					
Média		0,29	0,41	0,31	0,59	0,44						
Jejuno	24	0,73	1,00	0,83	1,48	0,96	1,00	21,40	0,1619	0,0185	0,9935	NS
	30	0,44	0,74	0,87	1,71	0,58	0,87					
	36	0,32	0,54	0,60	1,08	0,37	0,58					
Média		0,49	0,76	0,77	1,43	0,64						
Rim	24	0,47	0,74	0,47	0,85	0,40	0,58	14,30	0,4069	0,0311	0,8788	0,0202**
	30	0,18	0,46	0,44	0,75	0,31	0,43					
	36	0,22	0,36	0,45	0,75	0,64	0,48					
Média		0,29	0,52	0,45	0,78	0,45						
Útero	24	0,51	0,36	0,67	0,51	0,20	0,45a	14,10	0,0013	0,7033	0,6184	NS
	30	0,30	0,26	0,21	0,50	0,47	0,35a					
	36	0,08	0,06	0,06	0,17	0,04	0,08b					
Média		0,30	0,23	0,31	0,39	0,24						

CV% = Coeficiente de variação; NS = Não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ** Efeito quadrático ($y = -1E-07x^2 + 0,0005x + 0,2805$; $R^2: 0,6973$), Ponto máximo em 2500 FTU. Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

Tabela 14. Equações de regressão dos parâmetros de fosfatase alcalina (FA), ácido úrico (AU) e expressão de Calbindin-D28K nos rins de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase, em diferentes ambientes térmicos.

Parâmetros	Efeito	Equação	R ²	Nível
FA (U/L)	Linear	$y = 0,0185x + 268,75$	0,2972	-
AU (mg/dl)	Linear	$y = -0,0003x + 3,8874$	0,4993	-
Rim	Quadrática	$y = -1E-07x^2 + 0,0005x + 0,2805$	0,6973	2500 FTU ^{Max}

Tabela 15. Expressão gênica de TRPV6 nos rins de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo superdosagem de fitase e submetidas a diferentes temperaturas.

Parâmetros	Temperatura	Fitase (FTU/Kg)					Média	CV%	<i>p-Value</i>			
		0	500	1000	1500	3000			Temperatura	Fitase	Temp x Fit	Regressão
Expressão	24	0,359	0,718	0,514	0,475	0,534	0,520					
Rim	30	0,177	0,258	0,481	0,770	0,244	0,386	14,00	0,0947	0,1611	0,5555	NS
	36	0,164	0,253	0,246	0,385	0,372	0,284					
	Mean	0,233	0,410	0,414	0,544	0,384						

CV% = Coeficiente de variação; NS = Não significativo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas comparam temperaturas dentro de cada concentração de fitase, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Tratamento 1 (0FTU); Tratamento 2 (500FTU); Tratamento 3 (1000FTU); Tratamento 4 (1500FTU); Tratamento 5 (3000FTU).

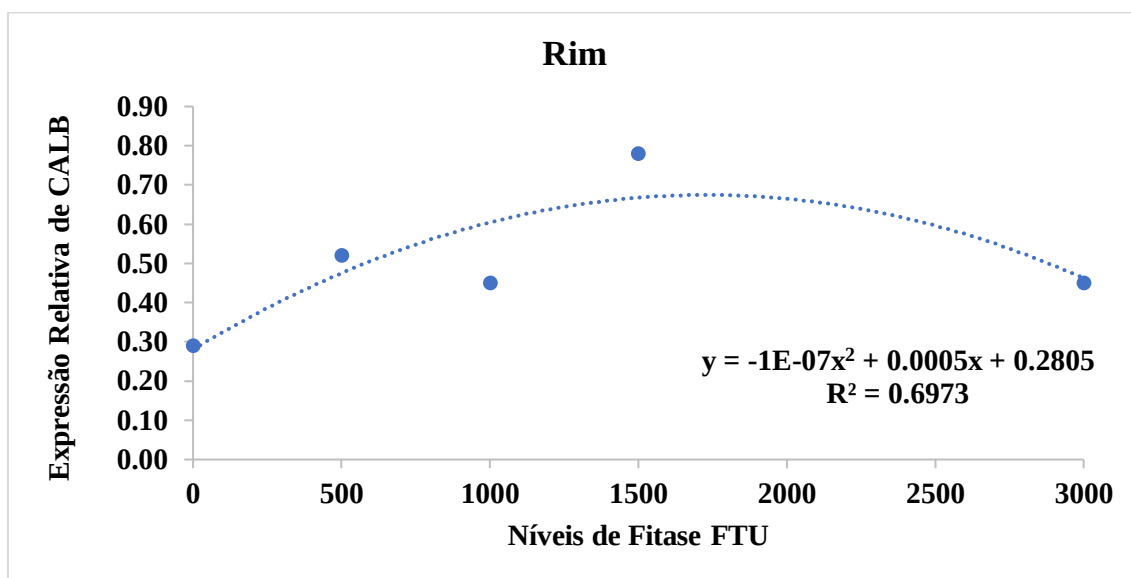


Figura 10 - Expressão do gene Calbindin-D28K nos rins de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.

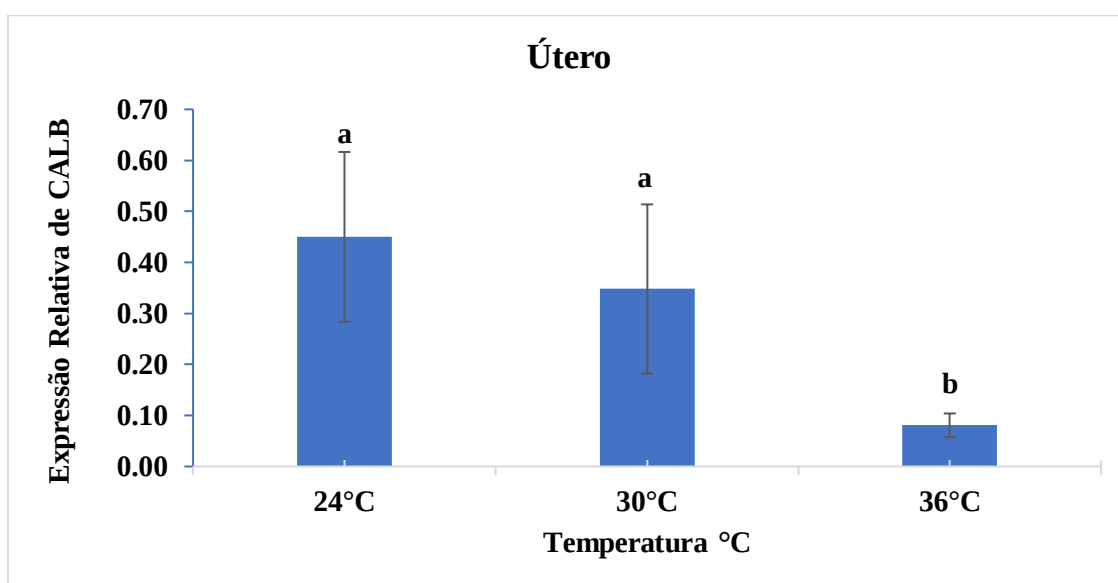


Figura 11. Expressão do gene Calbindin-D28K no útero de codornas japonesas alimentadas com diferentes doses de fitase e submetidas a três temperaturas.

4.6 DISCUSSÃO

4.6.1 Parâmetros de desempenho

O estresse térmico (ETC) tem sido uma preocupação crescente para os produtores de aves, especialmente em regiões de clima tropical, devido aos seus impactos prejudiciais nas aves poedeiras. Esse tipo de estresse provoca uma série de alterações fisiológicas, como estresse oxidativo, desequilíbrio ácido-base e comprometimento do sistema imunológico. Tais mudanças resultam em aumento da taxa de mortalidade, diminuição da eficiência alimentar e redução no peso corporal, consumo de ração, produção de ovos e desenvolvimento ósseo (Ribeiro *et al.*, 2024).

Em nossa pesquisa, a exposição das aves a altas temperaturas mostrou-se altamente prejudicial à produção. Codornas submetidas a estresse térmico severo (36°C) apresentaram uma significativa redução no consumo de ração, resultando em ingestão insuficiente de nutrientes e vitaminas, fundamentais para o desenvolvimento das aves, especialmente no que se refere à formação óssea. O efeito da temperatura sobre o consumo de ração (CR) foi semelhante ao encontrado por Santos *et al.* (2019), que relataram uma redução no consumo em codornas japonesas expostas a temperaturas elevadas (35°C). De forma similar, durante o estresse térmico, Li *et al.* (2015) e Kapetanov *et al.* (2015) relataram que as galinhas reduziram o tempo de alimentação para diminuir a produção de calor, o que pode indicar a redução do CR. Akdemir *et al.* (2019), ao avaliar o efeito do estresse térmico em codornas poedeiras (*Coturnix japonica*), afirmaram que aves expostas a 34°C apresentaram menor consumo de ração, menor produção e peso de ovos, além de pior conversão alimentar.

Para codornas poedeiras, a faixa de conforto térmico está entre 21 °C e 27 °C (Alagawany *et al.*, 2017). Em nossa pesquisa, observamos que animais expostos a 30 °C apresentaram maior produção total e massa de ovos em relação aos mantidos a 24 °C e 36 °C. Esse achado é interessante, pois embora 30 °C esteja fora da faixa de conforto, parece proporcionar uma condição em que as codornas conseguem otimizar sua produção, possivelmente devido à sua maior tolerância ao calor. Diferente das galinhas poedeiras e dos frangos de corte, as codornas poedeiras possuem uma relação área de superfície: volume corporal mais favorável, o que aumenta sua capacidade de dissipar calor endógeno (Porto *et al.*, 2021). Mesmo que 30 °C esteja acima do ideal, elas conseguem tolerar essa temperatura, ainda que precisem de uma

maior ingestão de vitaminas e minerais para compensar as mudanças metabólicas causadas pelo estresse térmico (Truong *et al.*, 2023).

Diversas estratégias nutricionais têm sido utilizadas para atenuar os efeitos negativos do ETC na saúde óssea das aves (Hosseini-Vashan *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2024). A fitase destaca-se como uma proposta para atenuar os efeitos do estresse térmico, pois além de possibilitar a degradação da molécula de fitato presente nos ingredientes das dietas, liberando fósforo e cálcio (Hirvonen *et al.*, 2019), importantes para o desenvolvimento corporal e ósseo dos animais (Lee *et al.*, 2019), também liberam no processo, minerais e vitaminas, como por exemplo zinco e vitamina D, que estão ligados ao desenvolvimento ósseo (Zhang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021) e também atuam como fatores antioxidantes, removendo os radicais livres e protegendo as membranas celulares do estresse oxidativo causados pelas altas temperaturas (Ribeiro *et al.*, 2024).

O uso de concentrações crescentes de fitase em nosso estudo teve um impacto positivo na espessura da casca dos ovos, resultado diretamente associado ao aumento da disponibilidade e retenção de minerais essenciais, como cálcio e fósforo, proporcionado pela ação da fitase na quebra do fitato. Além disso, a suplementação dietética com 1500 FTU de fitase não só minimizou os efeitos deletérios do estresse térmico (36°C), como também melhorou a qualidade dos ovos ao aumentar a espessura da casca.

4.6.2 Bioquímica do sangue

A avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos é essencial para entender as respostas fisiológicas das codornas sob diferentes condições ambientais e dietéticas. A gama-glutamyltransferase (GGT), uma enzima de membrana associada principalmente aos epitélios biliar e renal nas aves, é um marcador relevante para monitorar a função hepática. Em nossa pesquisa, os níveis séricos de GGT permaneceram dentro da faixa de normalidade para aves (0-10 U/L) (Scholtz *et al.*, 2009; Rezende, 2017), sugerindo a ausência de lesão hepática ativa nas codornas, mesmo sob condições de estresse térmico.

Outro marcador importante é a fosfatase alcalina (FAL), uma enzima chave no metabolismo do cálcio e do fósforo em aves, desempenhando um papel importante nas atividades condrogênicas (formação de cartilagem) e osteoblásticas (formação

óssea), essenciais para o crescimento adequado dessas espécies. A FAL apresenta baixa atividade no fígado das aves, e seu aumento no soro ou plasma sanguíneo está fortemente associado à atividade osteoblástica e a diversas alterações ósseas, como crescimento acelerado, consolidação de fraturas, osteomielite, hiperparatireoidismo nutricional secundário e neoplasias (Barbosa *et al.*, 2011).

Em situações de estresse por calor, o metabolismo ósseo das codornas japonesas pode ser significativamente afetado, resultando em elevações nos níveis de fosfatase alcalina (FAL). Esse aumento pode ser atribuído a dois fatores principais: a intensificação da atividade osteoblástica, que é responsável pela formação de novo tecido ósseo, e a liberação de FAL pelas células ósseas em resposta ao estresse. A atividade osteoblástica elevada pode ocorrer como uma tentativa do organismo de compensar a mobilização de cálcio e fósforo, essencial para a formação da casca do ovo, que pode estar comprometida em condições de calor extremo (Franzini *et al.*, 2022).

A inclusão de fitase nas dietas pode melhorar significativamente a biodisponibilidade de fósforo e cálcio, uma vez que a enzima quebra o ácido fítico presente nos ingredientes vegetais, liberando fósforo inorgânico e cálcio que pode ser absorvido e utilizado pelo organismo. Esse aumento na disponibilidade de cálcio e fósforo estimula o metabolismo ósseo, promovendo a mineralização adequada dos ossos e, conseqüentemente, aumentando a atividade de enzimas relacionadas a esse processo, como a fosfatase alcalina. O efeito linear crescente nos níveis de FAL com o aumento dos níveis de fitase observado em nosso estudo pode ser atribuído à maior liberação de Cálcio e fósforo pela ação da enzima fitase, o que melhora a disponibilidade desses minerais essenciais para o metabolismo ósseo, favorecendo o desenvolvimento e a manutenção da saúde esquelética das aves.

Para as codornas poedeiras, os minerais cálcio (Ca) e fósforo (P) são essenciais e sua disponibilidade é mais crucial durante o período de postura. O cálcio e o fósforo, dentre todos os minerais, desempenham papel fundamental na construção do esqueleto, compondo de 80 a 85% da sua estrutura e são essenciais na formação das cascas dos ovos e no desenvolvimento muscular. Assim, esses minerais são indispensáveis para o funcionamento adequado do corpo animal (Ribeiro *et al.*, 2024).

Em nosso estudo, os níveis séricos de Ca e P das aves mantidas nas temperaturas 30 e 36°C demonstraram estar um pouco abaixo das recomendações (Ca: 20 a 30 mg/dL e P: 5 a 7g/L) (Thrall *et al.*, 2004). Isso pode ser justificado pelo

fato de que, em ambientes de altas temperaturas (36°C), as aves tendem a reduzir a ingestão de ração, limitando assim a disponibilidade de cálcio e fósforo na dieta. Essa diminuição na ingestão pode afetar as variações na absorção e a mobilização desses minerais no sangue, uma vez que o cálcio e o fósforo são essenciais para diversas funções fisiológicas, incluindo a formação da casca dos ovos e a manutenção da saúde óssea.

Barrett *et al.* (2019), ao avaliarem os efeitos do estresse térmico agudo e crônico sobre o desempenho, a qualidade dos ovos, a temperatura corporal e os parâmetros de gases sanguíneos de poedeiras, observaram que, sob estresse por calor, as aves tendem a apresentar níveis séricos reduzidos de Ca. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com poedeiras submetidas a estresse térmico, que demonstraram uma diminuição das concentrações plasmáticas de P em animais expostos a temperaturas de 34°C, indicando a ocorrência de estresse térmico severo (Wolfenson *et al.*, 1987; Ait-Boulahsen *et al.*, 1993; Usayran *et al.*, 2001; Persia *et al.*, 2003).

Por outro lado, embora as codornas sejam capazes de suportar temperaturas de até 30°C, essas aves requerem maiores quantidades de vitaminas e minerais em sua dieta devido a alterações em seu metabolismo (Ribeiro *et al.*, 2024). Neste sentido, os menores níveis séricos de Ca e P observados nos animais submetidos à temperatura de 30°C sinalizam uma maior utilização de nutrientes pelas aves para manter seu metabolismo normal, uma vez que o desempenho das aves nessa temperatura não foi inferior ao observado a 24°C.

Ribeiro *et al.* (2024), ao avaliarem o efeito de três faixas de temperatura (24, 30 e 36°C) em codornas japonesas, confirmaram que, a 30°C, as aves apresentaram uma maior eficiência na utilização do cálcio da dieta em comparação com aquelas expostas a 24°C, devido a uma maior demanda por esse mineral. Esses achados estão em concordância com os resultados do nosso estudo, demonstrando que as codornas possuem uma notável capacidade de adaptação às variações térmicas, ajustando seu metabolismo para otimizar a utilização de nutrientes essenciais, como cálcio e fósforo.

Essa capacidade de adaptação também reflete no estado geral de saúde das aves, incluindo a função renal. As concentrações de ácido úrico, que são indicativas da funcionalidade renal, mostraram-se dentro dos níveis normais em nosso estudo (< 15 mg/dL) (Thrall *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2021), sugerindo que, apesar das condições

de estresse térmico, as codornas foram capazes de manter a função renal adequada. Como o ácido úrico é um dos principais indicadores da integridade dos túbulos renais, essa manutenção de níveis normais reforça a resiliência das aves em situações de variação térmica, sem comprometimento da saúde renal. Além disso, os resultados do nosso estudo mostraram que a suplementação dietética com fitase não apenas minimizou os efeitos negativos do estresse térmico (36°C), mas, em um nível de 1500 FTU nessa mesma temperatura, também reduziu os níveis séricos de ácido úrico das aves, promovendo uma melhor saúde renal mesmo sob condições de estresse por calor.

4.6.3 Expressão gênica de Calbindin-D28K

A calbindin, tem sido descrita em estudos em suas duas formas principais: calbindin-D9K, uma proteína de baixo peso molecular presente no intestino de mamíferos, e calbindin-D28K, uma proteína de alto peso molecular encontrada no rim de mamíferos (Fleet and Schoch, 2010), assim como no cérebro, rins, intestino e útero de aves (Bar, 2009; Fleet e Schoch, 2010), onde facilita o transporte de cálcio durante a formação da casca dos ovos (Moraes *et al.*, 2021).

Especificamente, a calbindin-D28k é uma proteína iônica intracelular de ligação ao Ca (Ca^{2+}), que atua como um transportador de Ca da membrana apical para a membrana basolateral e está envolvida na mobilização de Ca^{2+} no intestino (absorção), rim (absorção) e nas glândulas uterinas (liberação) (Wang *et al.*, 2022). Ela demonstra a capacidade não apenas de influenciar a absorção intestinal, mas também de modular a deposição desse mineral no útero. Essa capacidade afeta potencialmente não apenas a produção, mas também a qualidade das cascas dos ovos (Ribeiro *et al.*, 2024).

No presente estudo, a expressão gênica de Calbindin-D28K foi observada no intestino em todos os tratamentos analisados, corroborando os achados anteriores sobre sua presença em poedeiras (Wasserman e Taylor, 1966; Moraes *et al.*, 2021). Entretanto, não foram detectadas alterações na expressão gênica de Calbindin-D28K em resposta ao aumento da temperatura nem à elevação dos níveis de fitase nas dietas. Esses resultados sugerem que, apesar da exposição ao estresse térmico, não houve mudança significativa no transporte de cálcio mediado por calbindin no intestino. Em concordância com nossos resultados, Moraes *et al.* (2021), ao

investigarem o efeito de quatro faixas de temperatura (20, 24, 28 e 32°C) em codornas poedeiras, também verificaram que o aumento da temperatura não influenciou a expressão gênica de calbindin-D28K no intestino dessas aves.

O rim é um órgão crucial na regulação dinâmica da homeostase mineral durante o ciclo de oviposição, desempenhando papel central na reabsorção e excreção de cálcio e fósforo. Ele garante o equilíbrio desses minerais no sangue, assegurando que os níveis adequados sejam mantidos para sustentar as demandas fisiológicas, como a formação da casca do ovo e a manutenção da saúde óssea (Sinclair-Black *et al.*, 2024). Os resultados deste estudo indicam que nos rins, a expressão gênica de Calbindin-D28K foi positivamente modulada pelos níveis de fitase na dieta. A inclusão de fitase é essencial para a quebra da molécula de fitato (principal forma de armazenamento de fósforo nos ingredientes vegetais), liberando não apenas fósforo, mas também aumentando a disponibilidade de outros nutrientes importantes, como cálcio, minerais e vitaminas. Entre essas vitaminas, a D3, em sua forma metabolicamente ativa, 1,25 (OH)₂D₃, é crucial para a absorção e utilização do cálcio pelas aves (Moraes *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2024).

Nos rins, a 1,25(OH)₂D₃, ao se ligar ao VDR (Vitamin D Receptor), ativa essa molécula, permitindo que ela se mova do citoplasma para o núcleo da célula, onde se une a regiões específicas do DNA (Chacar *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2022). Essa interação estimula a expressão de genes responsáveis pela absorção de cálcio, como a Calbindin-D28K, que desempenha papel fundamental no transporte e na regulação do cálcio nas células dos rins, facilitando a reabsorção desse mineral essencial para a manutenção da saúde óssea e a produção de ovos (Moraes *et al.*, 2021). A suplementação com fitase em níveis crescentes em nosso estudo mostrou ser eficaz ao elevar a expressão desse transportador, com 1500 FTU proporcionando o maior nível de expressão de Calbindin-D28K nos rins das codornas.

O útero é um órgão essencial na formação da casca do ovo, atuando na mobilização e deposição de cálcio, principalmente na forma de carbonato de cálcio (CaCO₃), para a mineralização da casca (Andrade *et al.*, 2023). Esse processo é fundamental para garantir a rigidez e integridade da casca, proporcionando proteção adequada aos ovos. Para o tecido uterino, a expressão gênica de Calbindin-D28k teve efeito das temperaturas. Em temperaturas elevadas (36°C), ocorre uma redução na presença do transportador de cálcio Calbindin-D28K no útero, devido à menor conversão da vitamina D3 em sua forma metabolicamente ativa, 1,25(OH)₂D₃ (Moraes

et al., 2021). Esse metabólito é essencial para a absorção e utilização do cálcio, e o estresse térmico compromete esse processo, resultando em menor expressão de Calbindin-D28K no útero, o que afeta a deposição de cálcio na formação da casca do ovo (Ebeid *et al.*, 2012). Nossos achados confirmam que, em temperaturas elevadas, a expressão de Calbindin-D28K é reduzida, o que prejudica a deposição de cálcio na formação da casca do ovo e impacta sua qualidade.

4.6.4 Expressão gênica de TRPV6

O canal iônico TRPV6 (Transient Receptor Potencial Vanilloid Channel Type 6) atua como um canal epitelial de cálcio em órgãos e glândulas que se caracterizam por alta demanda de transporte de cálcio. Segundo alguns estudos (Brown *et al.*, 2005; Bianco *et al.*, 2007), esse canal iônico exerce efeito facilitador na entrada de cálcio nas células epiteliais, expresso nos epitélios de absorção e reabsorção intestinal e renal, mas ainda há pouca informação sobre seu padrão de expressão em codornas poedeiras (Moraes *et al.*, 2021). No presente estudo, a expressão gênica de TRPV6 foi observada no rim em todos os tratamentos analisados, corroborando os achados anteriores sobre sua presença em codornas poedeiras (Moraes *et al.*, 2021). Entretanto, não foram detectadas alterações na expressão gênica de TRPV6 em resposta ao aumento da temperatura nem ao efeito das doses de fitase utilizadas. Assim, mesmo com a suplementação de fitase ou variações de temperatura, o TRPV6 pode não necessitar de uma maior expressão para manter a absorção de cálcio eficiente.

4.7 CONCLUSÃO

A suplementação com fitase trouxe benefícios significativos às aves, especialmente aquelas mantidas em temperaturas de 30°C, devido ao aumento na demanda por vitaminas e minerais provocado pelas alterações metabólicas. A fitase melhorou a eficiência da absorção de cálcio (Ca), ao estimular a maior expressão de calbindin-D28K nos rins, o que favoreceu uma maior reabsorção de Ca para ser utilizado na produção total de ovos. Além disso, a suplementação dietética com 1500 FTU de fitase não apenas minimizou os efeitos deletérios do estresse térmico (36°C), mas também aumentou a espessura da casca dos ovos, melhorando sua qualidade, e reduziu os níveis séricos de ácido úrico, refletindo em uma melhor saúde renal.

REFERÊNCIAS

- AIT-BOULAHSEN, A.; GARLICH, J.D.; EDENS, F.W. Calcium deficiency and food deprivation improve the response of chickens to acute heat stress. **The Journal of Nutrition**, 123, 98–105, 1993. <https://doi.org/10.1093/jn/123.1.98>.
- AKDEMIR, F.; KÖSEMAN, A.; ŞEKER, I. Alchemilla vulgaris effects on egg production and quality expressed by heat-stressed quail during the late laying period. **South African Journal of Animal Science**, 49, 1-12, 2019. <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i5.8>.
- ALAGAWANY, M.; FARAG, M.R.; ABD EL-HACK, M.E.; PATRA, A. Heat stress: effects on productive and reproductive performance of quail. **World's Poultry Science Journal**, 73, 747-756, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000782>.
- ANDRADE, K.G.; CRUZ, F.K.; KANEKO, I.N.; NASCIMENTO, M.C.; IWAKI, L.C.; SANTOS, T.C. Daily Egg-Cycle in Japanese Quail: Serum Biochemistry, Bones, and Oviduct Changes. **Brazilian Journal Poultry Science**, 25, 001-012, 2023. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1599>.
- BABATUNDE, O.O.; COWIESON, A.J.; WILSON, J.W.; ADEOLA, O. The impact of age and feeding length on phytase efficacy during the starter phase of broiler chickens. **Poultry Science**, 98, 6742–6750, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pez390>.
- BAR, A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 152, 447-469, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.020>.
- BARBOSA, T.S.; MORI, C.K.; POLÔNIO, L.B.; PONSANO, E.H.G.; CIARLINI, P.C. Serum biochemical profile of laying hens in the region of Araçatuba, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, 32, 1583-1587, 2011. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1583>.
- BARRETT, N.W.; ROWLAND, K.; SCHMIDT, C.J.; LAMONT, S.J.; ROTHSCCHILD, M.F.; ASHWELL, C.M.; PERSIA, M.E. Effects of acute and chronic heat stress on the performance, egg quality, body temperature, and blood gas parameters of laying hens. **Poultry Science**, 98, 6684–6692, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pez541>.
- BEGGS, M.R.; ALEXANDER, R.T. Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development. **Experimental biology and medicine (Maywood)**, 242, 840-849, 2017. <https://doi.org/10.1177/1535370217699536>.
- BERNARDES, R.D.; OLIVEIRA, C.H.; CALDERANO, A.A.; FERREIRA, R.S.; DIAS, K.M.M.; ALMEIDA, B.F.; ALEIXO, P.E.; ALBINO, L.F.T. Effect of phytase and protease combination on performance, metabolizable energy, and amino acid digestibility of broilers fed nutrient-restricted diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 51, e20210211, 2022. <https://doi.org/10.37496/rbz5120210211>.

BIANCO, S.D.; PENG, J.B.; TAKANAGA, H.; SUZUKI, Y.; CRESCENZI, A.; KOS, C.H.; ZHUANG, L.; FREEMAN, M.R.; GOUVEIA, C.H.A.; WU, J.; LUO, H.; MAURO, T.; BROWN, E.M.; HEDIGER, M.A. Marked disturbance of 99calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. **Journal of Bone and Mineral Research**, 22, 274–285, 2007. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061110>.

BROWN, A.J.; KRITS, I.; ARMBRECHT, H.J. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 437, 51–58, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.007>.

CHACAR, F.C.; KOGIKA, M.M.; ZAFALON, R.V.A.; BRUNETTO, M.A. Vitamin D metabolism and its role in mineral and bone disorders in chronic kidney disease in humans, dogs, and cats. **Metabolites**, 10, 499, 2020. <https://doi.org/10.3390/metabo10120499>.

DALLMANN, H.M.; AVILA, V.S.; KRABBE, E.L.; SUREK, D.; BEDENDO, G.C.; TOLEDO, T.S.; DALLMANN, P.R.; ROLL, A.A.P.; ROLL, V.F.B.; RUTZ, F. Different phytase levels and energy densities in broiler diets on performance, nutrient digestibility, and bone integrity from 28 to 35 days of age. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 75, 280–292, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12790>.

EBEID, T.A.; SUZUKI, T.; SUGIYAMA, T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. **Poultry Science**, 91, 2282–2287, 2012. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01898>.

FARIAS, M.R.S.; LEITE, S.C.B.; SILVA, H.P.; PACHECO, D.B.; ALVES, G.C.; ABREU, C.G.; FREITAS, E.R. Superdosing phytases in the diets of light laying hens: productive performance and bone quality. **Brazilian Journal Poultry Science**, 23, 001–010, 2021. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1395>.

FLEET, J.C.; SCHOCH, R.D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 47, 181–195, 2010. <https://doi.org/10.3109/10408363.2010.536429>.

FRANZINI, B.D.; CRUZ, L.C.F.; SAMPAIO, S.A.; BORGES, K.F.; BARROS, H.S.S.; SANTANA, F.X.C.; GOUVEIA, A.B.V.S.; PAULO, L.M.; MINAFRA, C.S. Blood hematological and hormonal indicators of stress in poultry. **Research, Society and Development**, 11, e16111326303, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26303>.

HIRVONEN, J.; LILJAVIRTA, J.; SAARINEN, M.T.; LEHTINEN, M.J.; AHONEN, I.; NURMINEN, P.I. Effect of phytase on in vitro hydrolysis of phytate and the formation of myo-inositol phosphate esters in various feed materials. **Journal of Agricultural**

and Food Chemistry, 67, 11396–11402, 2019.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03919>.

HOSSEINI-VASHAN, S.J.; GOLIAN, A.; YAGHOBFAR, A. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. **International Journal of Biometeorology**, 60, 1183–1192, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1112-9>

KAPETANOV, M.; PAJIC, M.; LJUBOJEVIC, D.; PELIC, M. Heat stress in the poultry industry. **Archives of Veterinary Science**, 8, 87–101, 2015.
<https://doi.org/10.46784/e-avm.v8i2.117>.

LEE, S.A.; NAGALAKSHMI, D.; RAJU, M.V.L.N.; RAO, S.V.R.; BEDFORD, M.R.; WALK, C.L. Phytase as an alleviator of high-temperature stress in broilers fed adequate and low dietary calcium. **Poultry Science**, 98, 2122–2132, 2019.
<https://doi.org/10.3382/ps/pey566>.

LI, M.; WU, J.; CHEN, Z. Effects of heat stress on the daily behavior of Wenchang chickens. **Brazilian Journal Poultry Science**, 17, 559–566, 2015.
<https://doi.org/10.1590/1516-635X1704559-566>.

MANOBHAVAN, M.; ELANGO VAN, A.V.; SRIDHAR, M.; SHET, D.; AJITH, S.; PAL, D.T.; GOWDA, N.K.S. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility, and bone characteristics in broilers fed corn–soya-based diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 100, 93–100, 2016.
<https://doi.org/10.1111/jpn.12341>.

MARTÍNEZ-VALLESPÍN, B.; MÄNNER, K.; ADER, P.; ZENTEK, J. Evaluation of high doses of phytase in a low-phosphorus diet in comparison to a phytate-free diet on performance, apparent ileal digestibility of nutrients, bone mineralization, intestinal morphology, and immune traits in 21-day-old broiler chickens. **Animals (Basel)**, 12, 1955, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12151955>.

MORAES, L.R.; DELICATO, M.E.A.; CRUZ, A.S.; SILVA, H.T.F.N.P.; ALVES, C.V.B.V.; CAMPOS, D.B.; SARAIVA, E.P.; COSTA, F.G.P.; GUERRA, R.R. Methionine supplementing effects on intestine, liver, and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. **PLoS ONE**, 16, e0245615, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245615>

PERSIA, M.E.; UTTERBACK, P.L.; BIGGS, P.E.; KOELKEBECK, K.W.; PARSONS, C.M. 2003. Interrelationship between environmental temperature and dietary nonphytate phosphorus in laying hens. **Poultry Science**, 82, 1763–1768.
<https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1763>.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, e45, 2001. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.

PIENIAZEK, J.; SMITH, K.A.; WILLIAMS, M.P.; MANANGI, M.K.; VAZQUEZANON, M.; SOLBAK, A.; MILLER, M.; LEE, J.T. Evaluation of increasing levels of a microbial

phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. **Poultry Science**, 96, 370–382, 2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pew225>.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M.R.; ACAMOVIC, T.; MARES, P.; ALLYMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. **British Poultry Science**, 52, 245–254, 2011. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.560596>.

PORTO, M.L.; TEÓFILO, T.S.; CAVALCANTI, D.M.L.P.; FREITAS, C.I.A.; OLIVEIRA, M.F.; FONTENELE-NETO, J.D. Incubation variables, performance, and morphometry of the duodenal mucosa of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) submitted to different incubation temperatures and thermally challenged after hatching. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 73, 495–507, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12052>.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing** (Version 4.2.0). 2022. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acessado em: 2 Jul. 2024.

REZENDE, M.S. **Perfil bioquímico sanguíneo de linhagem pesada de frango de corte**. Tese (Doutor em Ciências veterinárias) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais – Brazil. 2017. 63p. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/21136/1/PerfilBioqu%C3%ADmicoSangu%C3%ADneo.pdf>. Acessado em: 3 Jul. 2024.

RIBEIRO, A.G.; SILVA, R.S.; COSTA, F.S.; SILVA, E.G.; SANTOS RIBEIRO, J.E.; SARAIVA, E.P.; COSTA, F.G.P.; GUERRA, R.R. Phytase super-dosing modulates bone parameters and the concentration of the calcium epithelial carrier Calbindin-D28k in quails (*Coturnix coturnix japonica*) under thermal stress. **Animal Production Science**, 64, AN24057, 2024. <https://doi.org/10.1071/AN24057>.

ROJAS, I.Y.M.; GONZÁLEZ, E.A.; MENOCAL, J.A.; SANTOS, T.T.; ARGUELLO, J.R.; COELLO, C.L. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum–soybean-meal-based diets. **Journal of Applied Animal Research**, 46, 314–321, 2017. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1299740>.

ROSTAGNO, M.H. Effects of heat stress on the gut health of poultry. **Journal Animal Science**, 98, skaa090, 2020. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa090>.

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.; R.F. OLIVEIRA, R.F.; BARRETO, S.L.T.; BRITO, C.O. 2017. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4th edn. UFV: Viçosa, Brazil. 2017. 488p. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4532766/mod_resource/content/1/Rostagno%20et%20al%202017.pdf. Acessado em: 2 Ago. 2024.

SANTOS, T.C.; GATES, R.S.; TINÔCO, I.F.F.; ZOLNIER, S.; ROCHA, K.S.O.; FREITAS, L.C.S.R. 2019. Productive performance and surface temperatures of Japanese quail exposed to different environmental conditions at the start of lay. **Poultry Science**, 98, 2830–2839. <https://doi.org/10.3382/ps/pez068>.

SCHOLTZ, N.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G.; SAUERWEIN, H. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. **Poultry Science**, 88, 1186–1190, 2009. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00546>.

SENA, T.L.; LEITE, S.C.B.; VASCONCELOS, A.M.; BEZERRA, M.M.R.; ABREU, C.G.; FARIAS, M.R.S.; SILVEIRA, R.M.F. Does dietary supplementation with phytases affect the thermoregulatory and behavioral responses of pullets in a tropical environment? **Journal of Thermal Biology**, 88, 102499, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102499>.

SHARMA, N.K.; CHOCT, M.; WU, S.B.; SMILLIE, R.; MORGAN, N.; OMAR, A.S.; SHARMA, N.; SWICK, R.A. Performance, litter quality and gaseous odour emissions of broilers fed phytase supplemented diets. **Animal Nutrition**, 2, 288–295, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.10.003>.

SILVA, V.C.; NASCIMENTO, R.S.; LOPES NETO, J.P.; RIBERIO MIRANDA, J.; MELO LOPES, F.F.; FURTADO, D.A. Bioclimatic zoning for quails in the dry period in the state of Paraíba, Brazil. **Revista Ceres**, 69, 125–130, 2022. <https://doi.org/10.1590/0034-737x202269020001>.

SINCLAIR-BLACK, M.; GARCIA-MEJIA, R.A.; BLAIR, L.R.; ANGEL, R.; ARBE, X.; CAVERO, D.; ELLESTAD, L.E. Circadian regulation of calcium and phosphorus homeostasis during the oviposition cycle in laying hens. **Poultry Science**, 103, 103209, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103209>.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.B.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. Veterinary hematology and clinical chemistry. **Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins**. 2004. 618p.

TRUONG, L.; MILLER, M.R.; SAINZ, R.D.; KING, A.J. Changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) blood gases and electrolytes in response to multigenerational heat stress. **PLoS Climate**, 2, e0000144, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000144>.

USAYRAN, N.; FARRAN, M.T.; AWADALLAH, H.H.; AL-HAWI, I.R.; ASMAR, R.J.; ASHKARIAN, V.M. Effects of added dietary fat and phosphorus on the performance and egg quality of laying hens subjected to a constant high environmental temperature. **Poultry Science**, 80, 1695–1701, 2001. <https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1695>.

WANG, X.; LI, P.; ZHAO, J.; JIAO, H.; LIN, H. The temporal gene expression profiles of calcium and phosphorus transporters in Hy-Line Brown layers. **Poultry Science**, 101, 101736, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101736>.

WASSERMAN, R.H.; TAYLOR, A.N. Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. **Science**, 152, 791–793, 1966.
<https://doi.org/10.1126/science.152.3723.791>.

WOLFENSON, D.; SKLAN, D.; GRABER, Y.; KEDAR, O.; BENGAL, I.; HURWITZ, S. Absorption of protein, fatty acids and minerals in young turkeys under heat and cold stress. **British Poultry Science**, 28, 739–742, 1987.
<https://doi.org/10.1080/00071668708417010>.

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. **Journal Poultry Science**, 59, 129–136, 2022.
<https://doi.org/10.2141/jpsa.0210019>.

YAN, F.F.; MOHAMMED, A.A.; MURUGESAN, G.R.; CHENG, H.W. Effects of a dietary synbiotic inclusion on bone health in broilers subjected to cyclic heat stress episodes. **Poultry Science**, 98, 1083–1089, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pey508>.

ZHANG, H.; MAJDEDDIN, M.; GAUBLOMME, D.; TAMINIAU, B.; BOONE, M.; ELEWAUT, D.; DAUBE, G.; JOSIPOVIC, I.; ZHANG, K.; MICHIELS, J. 25-hydroxycholecalciferol reverses heat-induced alterations in bone quality in finisher broilers associated with effects on intestinal integrity and inflammation. **Journal Animal Science Biotechnology**, 12, 104, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00627-6>.

ZHANG, Y.N.; WANG, S.; LI, K.C.; RUAN, D.; CHEN, W.; XIA, W.G.; WANG, S.L.; ABOUELEZZ, K.F.M.; ZHENG, C.T. Estimation of dietary zinc requirement for laying duck breeders: effects on productive and reproductive performance, egg quality, tibial characteristics, plasma biochemical and antioxidant indices, and zinc deposition. **Poultry Science**, 99, 454–462, 2020. <https://doi.org/10.3382/ps/pez530>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese investigou os efeitos do estresse térmico sobre codornas japonesas e a influência da superdosagem de fitase na mitigação desses impactos. Os resultados obtidos evidenciam que a suplementação com fitase melhora a absorção e o metabolismo do cálcio, favorecendo a qualidade da casca dos ovos e a integridade óssea das aves. Além disso, a enzima demonstrou potencial para minimizar os efeitos deletérios das altas temperaturas, contribuindo para o desempenho produtivo das codornas em condições desafiadoras.

Os achados reforçam a importância da nutrição como estratégia para otimizar a produção avícola, especialmente em regiões sujeitas a variações térmicas intensas. A fitase mostrou-se uma ferramenta promissora para mitigar os impactos do estresse térmico, melhorando a eficiência da utilização dos minerais e favorecendo a expressão de transportadores epiteliais de cálcio. Assim, recomenda-se sua inclusão em dietas formuladas para aves expostas a temperaturas elevadas, especialmente na concentração de 1500 FTU/kg, que apresentou os melhores resultados nos parâmetros avaliados.

Entretanto, novos estudos são necessários para aprofundar o conhecimento sobre a interação da fitase com outros nutrientes e sua eficácia em diferentes condições ambientais e genéticas. Pesquisas futuras devem considerar a análise dos efeitos a longo prazo, a viabilidade econômica da suplementação em escala comercial e a influência de fatores como linhagem, idade e estágio produtivo das aves. Além disso, investigações envolvendo biomarcadores do metabolismo mineral e técnicas avançadas de biologia molecular podem contribuir para uma compreensão mais detalhada dos mecanismos envolvidos na ação da fitase sob estresse térmico.

Dessa forma, espera-se que os resultados desta pesquisa sirvam de base para aprimorar práticas nutricionais na avicultura, promovendo sistemas de produção mais eficientes e sustentáveis, alinhados às demandas do setor e às condições climáticas adversas enfrentadas em diversas regiões do mundo.

ANEXOS

ANEXO A – HEAT STRESS IN JAPANESE QUAILS (*Coturnix japonica*): BENEFITS OF PHYTASE SUPPLEMENTATION.

ANEXO B – PHYTASE SUPER-DOSING MODULATES BONE PARAMETERS AND THE CONCENTRATION OF THE CALCIUM EPITHELIAL CARRIER CALBINDIN-D28K IN QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*) UNDER THERMAL STRESS.

ANEXO C – GENE EXPRESSION OF CALCIUM TRANSPORTERS CALBINDIN-D28K AND TRPV6 IN JAPANESE QUAILS (*Coturnix japonica*) SUBJECTED TO PHYTASE SUPER-DOSING AND UNDER DIFFERENT TEMPERATURES.

**ANEXO A – HEAT STRESS IN JAPANESE QUAILS (*Coturnix japonica*):
BENEFITS OF PHYTASE SUPPLEMENTATION**



Review

Heat Stress in Japanese Quails (*Coturnix japonica*): Benefits of Phytase Supplementation

Apolônio Gomes Ribeiro ^{1,*}, Raiane dos Santos Silva ¹, Dayane Albuquerque da Silva ²,
Júlio César dos Santos Nascimento ², Lilian Francisco Arantes de Souza ², Edijanio Galdino da Silva ³,
José Evangelista Santos Ribeiro ⁴, Danila Barreiro Campos ³, Clara Virgínia Batista de Vasconcelos Alves ³,
Edilson Paes Saraiva ¹, Fernando Guilherme Perazzo Costa ¹ and Ricardo Romão Guerra ^{1,*}

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba, Rodovia PB-079, Areia 58397-000, PB, Brazil; raianee.saantos@gmail.com (R.d.S.S.); edilson@cca.ufpb.br (E.P.S.); perazzo63@gmail.com (F.G.P.C.)

² Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife 52171-900, PE, Brazil; dayane.albuquerque.ds@gmail.com (D.A.d.S.); julio.nascimento@ufrpe.br (J.C.d.S.N.); lilian.arantes@ufrpe.br (L.F.A.d.S.)

³ Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade Federal da Paraíba, Rodovia PB-079, Areia 58397-000, PB, Brazil; edijanio@veterinario.med.br (E.G.d.S.); danila.campos@academico.ufpb.br (D.B.C.); claravasconcelos@hotmail.com (C.V.B.d.V.A.)

⁴ Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal da Paraíba, Rua João Pessoa s/n, Bananeiras 58220-000, PB, Brazil; vange_ribeiro@hotmail.com

* Correspondence: apoloniogomes962@gmail.com (A.G.R.); romaoguerra@gmail.com (R.R.G.)

Simple Summary: Heat stress in tropical regions significantly affects the production and quality of eggs in laying quails, which is worsened by phytate's antinutritional effects on calcium and phosphorus absorption. Phytase, an exogenous enzyme, can counteract these effects by breaking down phytate and improving mineral availability. This enzyme's use in Japanese quails optimizes calcium absorption and enhances their performance under heat stress. Phytase not only improves productivity but also protects the digestive and reproductive systems, promoting bird welfare and sustainability in poultry production.



Citation: Ribeiro, A.G.; Silva, R.d.S.; Silva, D.A.d.; Nascimento, J.C.d.S.; Souza, L.F.A.d.; Silva, E.G.d.; Ribeiro, J.E.S.; Campos, D.B.; Alves, C.V.B.d.V.; Saraiva, E.P.; et al. Heat Stress in Japanese Quails (*Coturnix japonica*): Benefits of Phytase Supplementation. *Animals* **2024**, *14*, 3599. <https://doi.org/10.3390/ani14243599>

Academic Editor: Sylwester Świątkiewicz

Received: 16 September 2024

Revised: 9 October 2024

Accepted: 31 October 2024

Published: 13 December 2024

Abstract: In tropical and subtropical climate regions, heat stress is one of the main causes of production losses in laying quails, aggravated by the antinutritional effects of the phytate in diet ingredients, which negatively affect the bioavailability of minerals, especially calcium and phosphorus. This situation results in a reduction in production and the quality of eggs from commercial laying quails. Several nutritional strategies are utilized to reduce the adverse effects of high temperatures and antinutritional factors such as phytate. Among these strategies, the use of exogenous enzymes, such as phytase, stands out as a viable alternative. Phytase breaks down phytate molecules, optimizing the absorption of essential minerals and improving productive performance and egg quality under unfavorable conditions. Specifically, it is recommended to use 1500 FTU of phytase, as it not only reduces the effects of thermal stress but also enhances eggshell thickness and calcium absorption. In this context, this bibliographic review sought to produce a document demonstrating the beneficial effects of the phytase enzyme on the hydrolysis of the phytate molecule, the availability of calcium for Japanese quails (*Coturnix japonica*), and its implications in thermal stress due to heat.

Keywords: antinutritional factors; calcium absorption; exogenous enzymes; laying quails; phytate



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Japanese quail (*Coturnix japonica*) farming has aroused the interest of breeders due to rapid growth, early sexual maturity, high productivity, low feed intake, and long production period [1,2]. This increased interest also motivates researchers to conduct studies aimed at improving and strengthening quail farming as a highly profitable commercial activity [3].

Exposure of birds to heat stress (HS) environments in tropical and subtropical areas negatively affects their productive performance and causes substantial economic losses [4–6]. It is well reported that the poor performance of heat stressed birds is mainly due to reduced feed intake in order to reduce the production of metabolic heat [6,7]. Furthermore, a state of imbalance occurs in the physiology and immunology of birds in response to exposure to HS [8]. In laying quails, exposure to heat of 34 °C decreased egg production and feed conversion, in addition to impairing egg quality [9,10]. Furthermore, yolk and serum cholesterol levels and general stress biomarkers increased in laying quails in heat stress environments [11].

Therefore, many attempts were made to minimize the negative effects of HS on the growth and physiological aspects of birds [12,13], including quails [5,6,9,11,14–16]. The use of the phytase enzyme stands out as an alternative, since its administration allows for the effective degradation of the phytate molecule present in diets, resulting in the subsequent release of minerals and other nutrients [17] to be used by animals subjected to heat stress.

Phytase (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase—IP6) belongs to a class of exogenous enzymes whose function is to degrade the phytate molecule (inositol hexaphosphate, IP6) present in diet ingredients, releasing phosphorus, calcium, and other nutrients to be used by animals [18,19].

In a study on broiler chickens exposed to heat stress and supplemented with phytase (2000 FTU), Maynard et al. [20] observed improvements in growth performance and a reduction in the incidence of muscular myopathy.

Farias et al. [21] evaluated the thermoregulatory, behavioral, and productive responses of laying hens raised in a hot environment. They reported that hens supplemented with phytase in their diets exhibited improved egg production.

Other studies demonstrated the beneficial effects of using phytase on animal performance [17,22,23], on the quality of the eggs, especially the shells [17,24], and on bone characteristics [25]. It is worth noting that these studies were carried out with broiler chickens and laying hens. In this context, this bibliographic review sought to produce a document demonstrating the beneficial effects of the phytase enzyme on the breakdown of the phytate molecule and the availability of calcium for Japanese quails (*Coturnix japonica*), and the implications on heat stress.

2. Japanese Quail (*Coturnix japonica*)

Quails are birds that originated in North Africa, Asia, and Europe. They are members of the Gallinacea order and the Phasianidae family, which also includes chicken and partridge; Pernicidae subfamily, *Coturnix* Genus [26,27]. They are animals that have been bred since ancient times as songbirds, decorative birds, and fighting birds [28]. The first records of domestication date back to the end of the 19th century and beginning of the 20th century [29], when the Japanese began to crossbreed European quails with wild species, resulting in the creation of the domesticated bird known as *Coturnix japonica*, thus marking the beginning of their exploitation [30,31].

In Brazil, the commercial exploitation of quails began around 1989, when a large poultry company decided to set up the first farm in South Brazil and then began exporting frozen quail carcasses [32]. Since then, the activity has become very important in the Brazilian agricultural economy.

There are several attributes that have contributed to the increase in quail production in the country, such as the following: the rapid growth of the birds, precocity in production and sexual maturity (35 to 42 days), high productivity (average of 300 eggs/year), longevity in high production (14 to 18 months), low investment, as well as rapid financial return [26,33], and the need for a small area for production (200–250 cm² bedding system and 150–200 cm² cage system) [34,35].

In recent years, quail egg production has experienced significant growth, driven by increased consumer interest in this product. Eggs are recognized as a complete and balanced food source, rich in protein, and low in fat. Furthermore, their lipid portion

contains high concentrations of unsaturated fatty acids [36], giving them a high biological value and making them affordable for consumers [37,38].

For a long time in Brazil and other tropical countries, diets for quails were formulated based on the standards of the National Research Council—NRC [39] and of the Institut National de La Recherche Agronomique—INRA [40], which are based on the nutritional levels established for laying hens and/or broilers. However, this approach often resulted in diets with an excess or deficiency of essential nutrients for quails. A rare exception to this practice is the Nutritional Recommendation Tables for Japanese and European Quails, developed by Silva and Costa [41] based on experiments carried out in Brazil.

The 4th and 5th editions of the Brazilian tables of nutritional requirements for poultry and swine, prepared by Rostagno et al. [42,43], introduced specific requirements for Japanese quails. However, the increasing research on the nutrition of laying quails is of utmost importance. This is due to recent increases in production costs, especially of ingredients used in poultry feed, making it vital to adopt nutritional strategies that maximize nutrient utilization, resulting in greater production efficiency.

3. Influence of Heat Stress on Japanese Quail Production

In thermoneutral conditions (range of temperatures where a bird can maintain its body temperature with minimal effort), birds require less energy to maintain a stable body temperature, which allows them to direct most of the energy from food to productive and reproductive processes. Considering the substantial influence of environmental conditions, such as temperature and relative humidity on the production and welfare of birds, it is crucial to monitor and manage these conditions appropriately in order to optimize production [44].

The poultry industry often faces adverse environmental conditions, with exposure to heat stress being one of the most common. Heat stress (HS) occurs when an animal's heat production exceeds its ability to dissipate it into the environment [45]. In circumstances where the ambient temperature exceeds the thermoneutral range (laying quails, 21 °C to 27 °C [46], birds tend to reduce their physical activity and food intake to control heat production. In addition, they increase panting and water consumption to facilitate heat dissipation through evaporation [47].

Panting is a phenomenon exhibited by birds when they open their beaks to increase the rate of respiration and evaporative cooling of the respiratory tract. During panting, CO₂ excretion occurs faster than cellular CO₂ production, which alters the standard bicarbonate buffer system in the blood. The reduction in CO₂ leads to a decrease in the concentration of carbonic acids (H₂CO₃) and hydrogen ions (H⁺). In contrast, the concentration of bicarbonate ions (HCO₃[−]) increases, thus raising the pH of the blood, i.e., the blood becomes alkaline. To manage this scenario and preserve blood pH balance, birds initiate a process of increased excretion of bicarbonate ions (HCO₃[−]) and retention of hydrogen ions (H⁺) by the kidneys. Elevated H⁺ alters the acid–base balance, leading to respiratory alkalosis and metabolic acidosis, and it is associated with a decline in the productive performance of birds [48]. However, it is important to note that, although the kidneys play a crucial role in compensating for alkalosis, prolonged exposure to high temperatures can result in the onset of a condition known as chronic alkalosis [49,50].

Furlan et al. [51] conducted a study with five commercial strains of broiler chickens. Subjecting them to heat stress, he observed that, regardless of the strain, there was a decrease in CO₂ content and an increase in blood pH as the temperature increased [50].

Ruzal et al. [52] state that respiratory alkalosis caused by panting has a deleterious effect on laying hens due to its effect on egg quality. Respiratory alkalosis evidently causes an increase in arterial blood pH associated with a reduction in the partial pressure of CO₂. This action leads to a decline in plasma bicarbonate levels and an increase in the binding between organic acid and calcium ion content, thus causing declines in the availability of bicarbonate and calcium ions and weakening egg quality.

Laying quails may also suffer impacts on their acid–base balance due to periods of intense heat, resulting in electrolyte and mineral imbalances, potentially culminating in smaller eggs with thinner shells. This phenomenon is mainly attributed to alkalosis, which reduces the availability of free calcium in the blood and increases the proportion of calcium bound to proteins or complexed with organic acids. Consequently, during heat stress, an increase in blood pH is observed due to the loss of carbon dioxide, simultaneously accompanied by a reduction in available calcium [50].

Vercese et al. [10] evaluated the performance and quality of the eggs of Japanese quails subjected to cyclical heat stress and observed that Japanese quails exposed to a temperature of 27 °C already showed signs of heat stress, such as reduced feed intake, egg weight, and egg mass. The cyclical increase in the ambient temperature to 36 °C negatively influenced the percentage of marketable eggs and egg production.

When evaluating the effect of heat stress on laying quails (*Coturnix japonica*), Akdemir et al. [16], stated that birds subjected to temperatures of 34 °C have lower feed intake, lower egg production and weight, in addition to greater feed conversion.

Cruvinel et al. [53], in their evaluation of different electrolyte balance values in the diet of Japanese quails (*Coturnix japonica*), found that heat stress negatively affects bone strength and density, performance, and egg quality.

In their research with laying quails, Moraes et al. [3] investigated the effects of heat stress compared to thermoneutral conditions. They highlighted that exposure to high temperatures can significantly impair bird performance, reflected in reduced feed intake, live weight gain, and efficiency. In addition, they observed a decrease in egg production, as well as in eggshell quality and thickness, due to the lower availability of calcium ions [54].

Lesson and Summers [55] state that, under conditions of respiratory alkalosis, there is a reduction in the calcification of eggs and bones, compromising the performance of birds and contributing to the increased incidence of leg problems in animals, as well as to the production of eggs with thin shells. Alkalosis limits the availability of anions necessary for the formation of calcium carbonate crystals in the eggshell [56] and, consequently, leads to poor egg quality. According to Campos [57], this outcome can result in a 12% reduction in eggshell thickness [10].

Another point is that, in situations of stress due to high temperatures (30–33 °C for quails), there is a decrease in the presence of the calcium transporter calbindin-D28k in the ileum, cecum, colon, and uterus of the birds [3], which results in the deterioration of eggshell quality under these conditions [58]. This occurrence can be explained by heat stress, which reduces the conversion of vitamin D3 into its metabolically active form, 1,25(OH)2D3, essential for the absorption and utilization of calcium [3]. Furthermore, stress also decreases antioxidant patterns, leading to the deficiency of or increased requirements for vitamins and minerals, especially zinc [59], considered a cofactor ion of the enzyme carbonic anhydrase responsible for calcium deposition in the eggshell [19,60].

4. Phytase Enzyme and the Hydrolysis of the Phytate Molecule

Phytic acid (*myoinositol* 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphodiuim) also known as Inositol-6-phosphate (Figure 1), phytate in its salt form [61], phytin, or phytic phosphorus is the main phosphorus storage system in plant seeds, such as cereal grains, nuts, oilseeds, and legumes [61,62]. Table 1 highlights the phytate levels in some foods used in animal feed.

Table 1. Phytate content in foods (based on dry matter).

Products	Phytate, %	Reference
Corn	0.78–1.05	[63,64]
Soybean	1.01–1.47	[64,65]
Sorghum	0.80	[66]
Cottonseed meal	2.65	[66]
Corn germ	2.97	[66]
Polished rice	0.60	[64,67]

Table 1. Cont.

Products	Phytate, %	Reference
Oats	0.79–1.01	[64,65]
Wheat	0.39–1.35	[64,68]
Soybean bran	1.0–1.5	[69]
Rice bran	5.90–6.48	[70,71]
Wheat bran	5.38	[63,64]
Whole wheat flour	2.22	[64,72]
White wheat flour	0.404	[64,72]

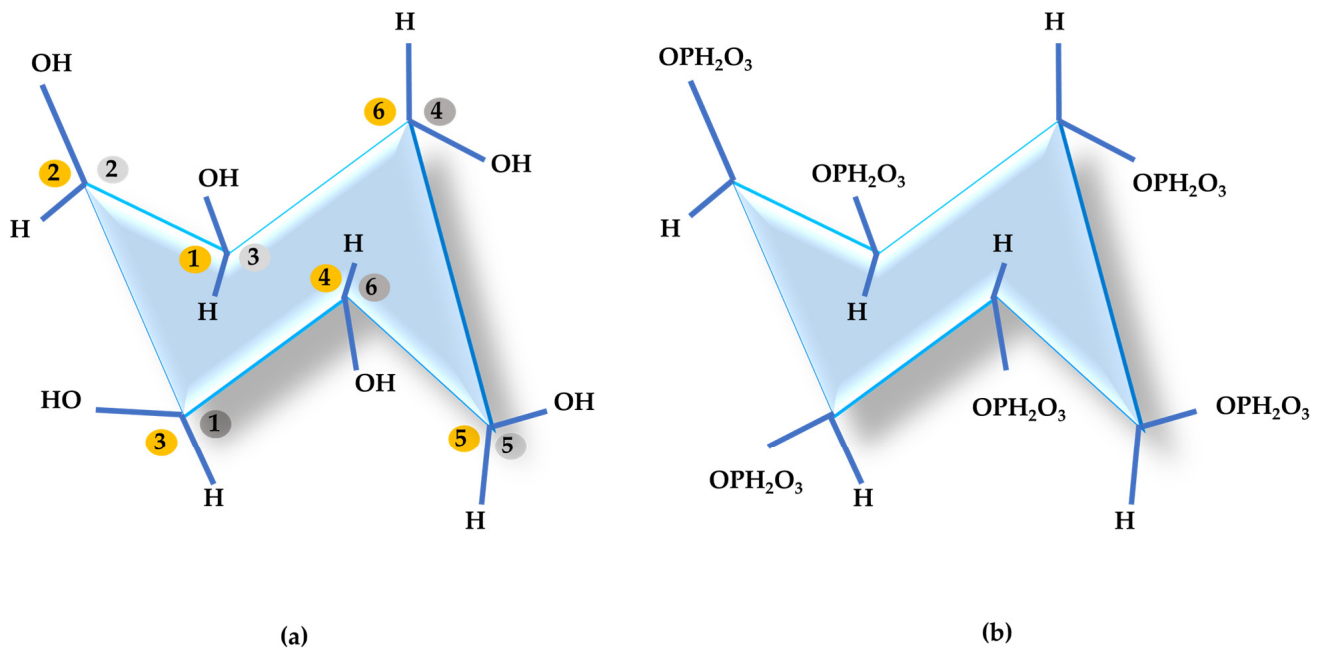


Figure 1. Myo-inositol (a) and myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphodide (InsP6) (b).

Approximately 60–80% of phosphorus in most cereal grains and oilseeds is bound to phytate [73], which is a chemical form of low availability for poultry and swine [74]. Phytate traps phosphorus and other cationic substances, preventing them from being fully utilized by birds [75]. According to Woyengo and Nyachoti [76], phytic acid contains 12 ionizable protons with pKa values ranging from 1.5 to about 10 [77,78]. Therefore, at all pH values normally observed throughout the gastrointestinal tract, phytate is capable of binding to cations, causing mineral unavailability.

In addition to making phosphorus unavailable, phytate also negatively influences the digestion and absorption of other minerals, amino acids, and the energy utilization of diets [79]. Phytate can create a wide variety of insoluble salts with divalent cations, such as calcium (Ca²⁺), magnesium (Mg²⁺), iron (Fe²⁺), zinc (Zn²⁺), copper (Cu²⁺), and manganese (Mn²⁺) [80], minerals that are considered nutritionally important, especially for laying hens. Thus, blood concentrations of phosphorus and calcium can be reduced, negatively affecting production processes [81]. Furthermore, phytic acid can also bind with proteins and inhibit the activity of some digestive enzymes, including trypsin, pepsin, and alpha-amylase [82].

Phytase or myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase (IP6) is a phosphatase commonly used in the diets of non-ruminant animals as a way to increase the bioavailability of phosphorus phytate and other nutrients [18]. This enzyme hydrolyzes phytic acid and its salts (phytate), producing inositol, inositol monophosphate, and inorganic phosphorus [83], releasing phosphorus, and improving the availability of other nutrients bound to the phytate molecule [84]. The activity of this enzyme is expressed in a Phytase Activity Unit (FTU), which means that the amount of enzyme required to release 1 µmol of inorganic

phosphorus per minute of reaction from sodium phytate, at a temperature of 37 °C and pH of 5.5 [85].

Phytase catalyzes the release of phosphate present in phytate and then produces *myo*-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis-, and monophosphates, as well as inorganic phosphate [86,87], (Figure 2). Enzymes can be classified into different classes according to some criteria, including the stereospecificity of phytate hydrolysis (carbon number in the *myo*-inositol ring of phytate at which dephosphorylation is initiated), pH optimum (alkaline or acid phytases), and their catalytic mechanism [88].

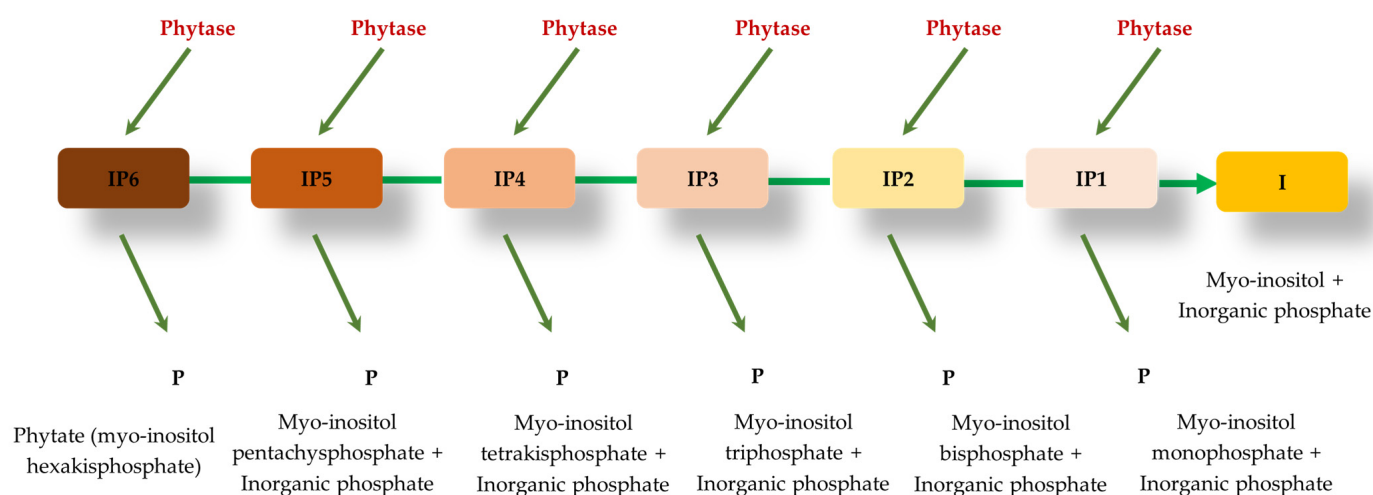


Figure 2. Hydrolysis of the phytate molecule through the action of the phytase enzyme: I (inositol); P (phosphate); IP6 (myo-inositol hexakisphosphate); IP5 (Myo-inositol pentachysphosphate); IP4 (Myo-inositol tetrakisphosphate); IP3 (Myo-inositol triphosphate); IP2 (Myo-inositol bisphosphate); and IP1 (Myo-inositol monophosphate).

Based on stereospecificity, according to the International Union of Biochemistry (UIB), three groups of phytases can currently be distinguished, depending on the position in the Inositol ring where dephosphorylation is initiated, namely: 3-phytases (EC 3.1.3.8), 6-phytases (EC 3.1.3.26), and 5-phytases (EC 3.1.3.72) [89–91], as shown in Figure 3.

Description of the three phytases:

(a) 3-phytase (EC 3.1.3.8): Myo-inositol hexakisphosphate-3-phosphohydrolase, initiates the hydrolysis of the ester bond at the third position of myo-inositolhexakisphosphate into myo-inositol-1,2,4,5,6-pentakisphosphate and orthophosphate, isolated from *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Pseudomonas*, and *Klebsiella* sp. ASR1.

(b) 4-phytase, also known as 6-phytase (EC 3.1.3.26): myo-inositol hexakisphosphate-6-phosphohydrolase hydrolyzes the ester bond at the sixth position of myo-inositolhexakisphosphate to myo-inositol-1,2,3,4,5-pentakisphosphate and orthophosphate, isolated from plants, *E. coli*, *Paramecium*.

(c) 5-phytase (EC 3.1.3.72): Myo-inositol-hexakisphosphate-5-phosphohydrolase, initiates the hydrolysis of the ester bond at the fifth position of myo-inositolhexakisphosphate to myo-inositol-1,2,3,4,6-pentakisphosphate and orthophosphate, isolated from *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*.

Depending on their optimal pH, phytases can be further classified as acidic or alkaline, acidic when their pH is between 2.5 and 6.0, and alkaline when their pH is close to 8.0 [92–94]. Based on their structural differences and their catalytic mechanism, phytases can be classified into four groups, which are histidine acid phosphatases (HAPs), β -helical phytases (BPPs), cysteine phytases (CPs), or purple acid phosphatases (PAPs) [88,95] (Figure 3).

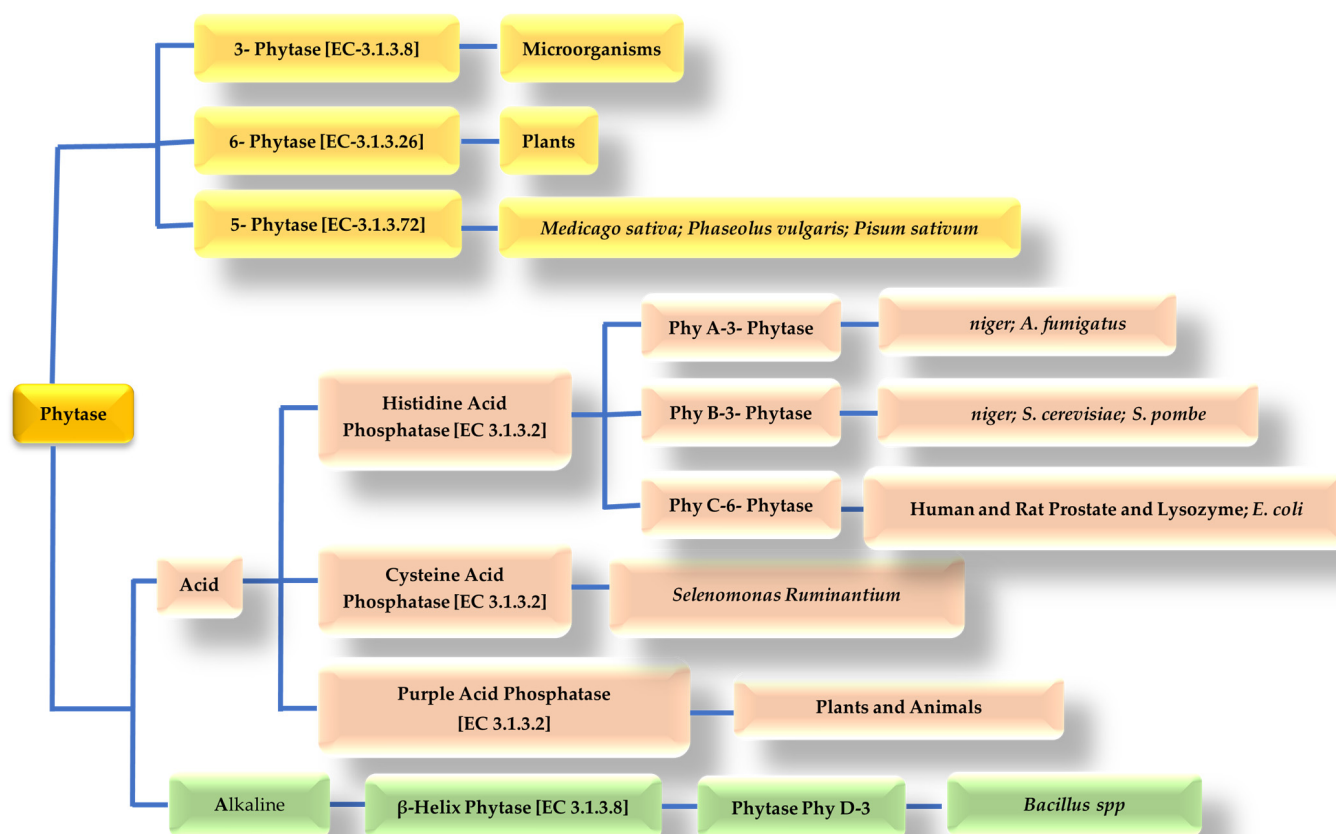


Figure 3. Classification of phytases.

5. Phytase Overdose

Phytase overdose refers to the addition of phytase to diets at levels higher than those recommended (500 FTUs/kg) [96] and may even be double or triple these recommendations. Such dosages have been used to effectively combat the antinutritional effects of phytate, improving animal performance [22,84].

According to Cowieson et al. [97], there are three main mechanisms for which the use of high doses of phytase can have beneficial effects:

1. Greater quantity of phosphate made available by the enzyme or greater proportion in the release of calcium and phosphorus;
2. Less phytate excreted, i.e., destruction of the antinutritional effect and increased generation of more soluble esters;
3. Generation of myo-inositol with vitamin/lipotropic effects.

There are several studies demonstrating the relevant effects of the use of phytase overdoses in broiler chicken diets: Nelson et al. [98] used 1–8 g of a phytase from *Aspergillus ficum* with 950 FTUs/kg in the diet of broilers (950 and 7600 FTUs/kg of feed). These authors evaluated that, apparently, 38.9% of the phytate disappeared when using the concentration of 950 FTUs/kg of the enzyme and 94.4% when using 7600 FTUs/kg, with greater responses for weight gain and bone ash in 21-day-old chickens when using 7600 FTUs/kg of phytase in the diets [84,97].

When evaluating the extra-phosphoric effects of overdoses of a microbial phytase produced from *E. coli*, Walk et al. [99] observed better feed conversion in broilers fed with 1500 FTUs/kg of phytase in the diet with a reduction in Ca by 0.16% and P by 0.15%. According to these authors, these findings could be related to the reduction in the antinutritional factors of phytate when using the enzyme in the diet.

When evaluating the effects of phytase overdose (SUNPHASE 5000 G) on the digestibility and bone development of broilers from 1 to 21 days of age, Fernandes et al. [100] observed a quadratic effect of phytase inclusion for the diameter and percentage of Ca and P of the femur, in which the inclusion of 1494 and 1220 FTUs, respectively, presented the best results. For the evaluation of the tibia, the diameter, length, and weight increased linearly with the inclusion of phytase, and, for resistance, a quadratic effect was observed, with 1265 FTUs being the best level.

In a study with four commercially available phytase sources supplemented at regular levels (250 and 500 FTUs/kg) and overdoses (100; 1500 and 2000 FTUs/kg) on live performance, bone mineralization, and apparent ileal digestible energy in broilers from 7 to 24 days of age, Leyva-Jimenez et al. [101] stated that, on days 14 and 22, all phytase sources improved ($p < 0.05$) body weight, weight gain, and bone mineralization when compared to birds on the negative control diet. Overall, phytase supplementation at the S level improved apparent ileal digestibility by 17% at 24 d. Throughout the growing period, the phytase overdose yielded ($p < 0.05$) better performance, bone characteristics, and energy digestibility than at the regular dietary level. In conclusion, all phytase sources were able to compensate for phosphorus deficiency and promote performance and bone mineralization. Higher phytase levels showed a greater response when compared to lower supplementation levels.

Given the satisfactory results with broilers, there is growing interest in the results with laying hens as well, taking into account that the use of Ca and P in laying hens is probably more important than in broilers [102] due to the greater requirement of these minerals in the formation of eggshells [84].

When evaluating the effects of overdose (450 FTUs or 900 FTUs) of two phytases (bacterial phytase or fungal phytase) on the performance, egg quality, biometry of the digestive organs, and bone quality of light laying hens in the first (58 weeks) and second (87 weeks) production cycles, Farias et al. [17] concluded that bacterial phytase produced from *Escherichia coli*, at a dosage of 450 FTUs, improved the egg production of light laying hens. According to these authors, the use of phytase in the diet of laying hens implies lower feed costs.

When evaluating the effects of an overdose (0; 500; 1000; 1500; and 3000 FTUs) of phytase on bone parameters and the concentration of the epithelial calcium carrier Calbindin-D28k in Japanese quails, Ribeiro et al. [103] had results that showed that phytase overdose not only increased the efficiency of calcium absorption but also stimulated a greater expression of calbindin-D28K in the duodenum and jejunum of the birds. This action resulted in improved calcium mobilization to the tibiae and increased egg production. Additionally, supplementation with 1500 FTUs of phytase reduced the negative effects of heat stress at 36 °C by increasing eggshell thickness. These studies highlight the importance of phytase overdosing as an effective strategy to improve bird health and productivity under heat stress conditions.

6. Role of Phytase in Reducing Heat Stress

As already well-documented, heat stress influences the performance of laying hens, as well as in any production system, constituting one of the main causes of production losses in tropical and subtropical regions [104]. Factors such as time of day, genotype, breeding system, and animal density interfere in thermoregulatory responses, leading to changes in the natural behavior of birds [19].

Nutritional strategies are widely used to reduce the negative effects of heat stress, such as adjusting protein and/or energy levels in diets, including fats or oils, supplementing with synthetic amino acids, using vitamins, and offering drinking water with mineral additives [105]. The use of exogenous enzymes such as phytase in the diet of birds stands out as one of these nutritional strategies implemented to overcome the effects caused by heat stress, resulting in better animal welfare [19]. Since birds do not produce enough phytase enzymes to hydrolyze the phytate molecule present in diet ingredients, the introduction

of this enzyme in their diets is necessary, as phytase catalyzes the hydrolysis of phytic acid, eliminating its antinutritional properties [82], thus promoting the release of phytic phosphorus present in plant foods, in addition to making other minerals available, such as calcium and vitamins, and increasing the digestibility of the nutrients in diets [21].

Phytase also has extra phosphoric effects, such as the release of proteins, amino acids, carbohydrates, minerals, and vitamins that are complexed to the phytate molecule [106], in addition to improving the utilization of the dietary energy by the animals [101]. The phytase enzyme was also recognized for facilitating the availability of zinc [107]. According to Borges [108], this mineral is incorporated into some dietary formulations to reduce the effects of heat stress in birds, promoting better nutrient absorption during periods of stress, which can reduce losses, especially energy losses.

According to Hu et al. [109], at elevated temperatures, enzyme activity is greatly affected in birds. There is a significant change in the activity of metabolic enzymes in the body, thereby increasing the metabolic rate and therefore increasing the production of free radicals. Excess free radicals disrupt the oxidative and antioxidant balance of the body, leading to lipid peroxidation, DNA and protein damage, and the generation of oxidative stress.

Oxidative damage to the cell membrane by free radicals occurs during zinc deficiency, thus altering the status of enzymes and antioxidant substances [110]. Zinc (Zn) is a vital mineral element found in birds, predominantly in the bones and liver. It plays an essential role in growth and in the proper functioning of the immune system of birds. In addition, zinc contributes to the development of birds, improves feed conversion efficiency, strengthens immunity, and helps prevent diseases [109].

Zinc is required for the activity of over 300 enzymes and participates in many enzymatic and metabolic functions in the body [111]. One of the most important functions of Zn is its participation in the antioxidant defense system. Zinc deficiency increases oxidative damage to cell membranes caused by free radicals [59,111]. Zn exerts its antioxidant action by increasing the synthesis of metallothionein, a protein rich in cysteine, which acts as a free radical scavenger [112]. Another proposed mode of action for Zn as an antioxidant is its interaction with vitamin E, because vitamin E status is impaired in zinc-deficient animals [59]. Furthermore, zinc can occupy iron and copper binding sites in lipids, proteins, and DNA and thus exert a direct antioxidant action [110]. Furthermore, zinc increases antioxidant capacity in birds by increasing the activity of copper–zinc superoxide dismutase and zinc metalloenzymes and altering DNA and the chromatin structure to influence gene expression [109].

Another point related to the importance of the phytase enzyme in the availability of Zn in the diets of birds subjected to heat stress is that this mineral is a cofactor of the enzyme carbonic anhydrase, which plays a vital role in the formation of the eggshell [103]. In addition, Zn can be incorporated in the growth stage during the formation of the calcite crystal [113]. Carbonic anhydrase is an enzyme that catalyzes the hydration of metabolic CO_2 to HCO_3^- , the precursor of eggshell carbonate. Several studies reported that the partial or complete inhibition of carbonic anhydrase can result in thin-shelled or shell-free eggs [113,114]. It was also reported that eggshell quality is reduced by the inhibition of carbonic anhydrase activity or anhydrase mRNA expression in laying hens [113,115,116].

Studies have demonstrated the positive effects of using phytase in the feed of poultry under heat stress: Mohebbifar et al. [117] investigated the effects of phytase supplementation (0 and 150 FTUs) in diets with different levels of rice bran and non-phytic phosphorus on productive performance, egg quality, leukocyte profile, and serum lipids in laying hens raised under high environmental temperatures. They found that diets with high phytate content (such as those rich in rice bran) and/or low non-phytic phosphorus (2.5 g/kg), when supplemented with phytase, resulted in significant improvements in the performance and egg quality of birds subjected to heat stress.

When evaluating the simple and combined effects of phytase and citric acid on performance, nutrient digestibility, bone characteristics, intestinal morphology, and blood

parameters of Japanese quails (aged 1 to 35 days) and fed with low-phosphorus diets, Hezaveh et al. [118] found that phytase supplementation resulted in significant improvements. There was an increase in bird performance, protein, ash and phosphorus digestibility coefficients, metabolizable energy, bone mineralization, and intestinal morphology, even with a 0.12% reduction in non-phytic phosphorus in the diet.

When evaluating phytase levels (0; 200; 400 and 600 FTUs/kg) in the diet on the performance and quality of eggs of Japanese quails subjected to heat stress, Lima et al. [119] concluded that the use of phytase improved the performance and quality of the eggs of the birds. The best phytase level for better efficiency in the use of phosphorus by the birds and for better egg mass was 463 FTUs/kg.

When evaluating the effects of an overdose of phytase on bone parameters and the concentration of the epithelial calcium carrier Calbindin-D28k in Japanese quails under heat stress, Ribeiro et al. [103] demonstrated that phytase supplementation brought benefits to the birds, especially those kept at temperatures of 30 °C, given the greater demand for vitamins and minerals, due to changes in their metabolism. Phytase improved Ca absorption efficiency and positively influenced the increased expression of anti-calbindin-D28K in the duodenum and jejunum of the birds. This action provided greater Ca mobilization to the tibiae and higher total egg production for the birds kept at this temperature. Furthermore, these results demonstrate that dietary phytase supplementation at a level of 1500 FTUs was able to reduce the deleterious effects of heat stress (36 °C) and positively influenced the increase in quail eggshell thickness.

In this context, it can be seen that the use of phytase can positively influence the reduction in the effects of heat stress and antinutritional factors such as phytate in Japanese quails.

7. Calcium and Phosphorus in the Diet of Laying Quails (*Coturnix japonica*)

According to current practice, diets for commercial laying quails are formulated based on the recommendations of tables of nutritional requirements specific to each lineage, such as editions 4 and 5 of the Brazilian Tables of Nutritional Requirements for Poultry and Swine, prepared by Rostagno et al. [42,43], National Research Council [39], and the Agriculture and Food Research Council (AFRC) [120]. Reducing the density of nutrients such as phosphorus in the feed and using phytase supplementation can reduce the total cost of the diet, thus contributing to the profitability of egg production [121].

Calcium (Ca) and phosphorus (P) are essential for laying quails, and their availability is most crucial during the laying period [122]. Among all the minerals, calcium and phosphorus play the most fundamental role in the construction of the skeleton, from 80 to 85% of its structure. These minerals are essential in the formation of eggshells and in muscle development. Thus, they are indispensable for the proper functioning of the animal's body [123].

Calcium is the most abundant mineral in the animal organism, representing a body proportion of 1:75 [124]. Most calcium (99%) is present in bones [125,126] in the form of hydroxyapatite, an inorganic crystalline structure composed of calcium and phosphorus $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ [124]. During the processes of absorption, metabolism, and excretion, calcium and phosphorus interact, maintaining a ratio of approximately 2:1 [127]. In addition to composing the bone structure, calcium is also present in soft tissues (1%), where it performs several functions, such as activating enzymes, transmitting nerve stimuli, and participating in the blood coagulation process [124].

The use of calcium by the bird's body varies mainly with age. During the growth period of laying hens, most of the dietary calcium is directed towards the formation of bones [124]. In contrast, in the adult phase, calcium is predominantly used for egg production, specifically for shell formation [123]. The Ca necessary for the formation of the shell, which comes from bone resorption and intestinal absorption, is transported by the blood to the calcigenous chamber [124,128]. This transport is mediated by the activity of carbonic anhydrase, a crucial enzyme in eggshell formation [113].

Approximately 30% of the calcium required for eggshell formation is mobilized from the bones. This rate is because, in the uterus, where calcium carbonate is deposited, there is no calcium storage. The organic fraction of the shell is synthesized by glands, and calcium is mobilized directly from the blood, and the transfer of plasma to the uterus occurs very quickly [124,129].

The most obvious symptoms of calcium deficiency in young birds include delayed growth, reduced feed intake, and bone fragility [124]. In adult birds, the deficiency manifests itself in reduced egg production, thin-shelled eggs, and reduced ash and calcium content in bones [130,131].

Phosphorus, in turn, plays a crucial role in both the absorption and metabolism of calcium [132]. More than 80% of phosphorus is associated with calcium in bone formation, while the remainder is present in soft tissues [133,134]. Its functions include participation in bone structure (hydroxyapatite), in cell membranes in the form of phospholipids (lecithin), as phosphate in deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA) molecules, and in the form of energy molecules, such as adenosine diphosphate (ADP) and triphosphate (ATP) [132,133].

The skeleton functions as a reservoir of calcium and phosphorus in the body, and this function is especially crucial in laying hens, since the eggshell contains approximately 10% of the total calcium in the bird's body [124]. Therefore, there is a high demand for calcium to maintain blood homeostasis while the shell is forming [135]. Physiological mechanisms regulate skeletal integrity in response to different needs during the productive life of laying hens. The relative importance of the intestine and bones as sources of calcium depends on the concentration of this mineral in the diet [124,136].

In general, there are intestinal barriers, such as physical–chemical conditions, pH, and viscosity, which make it difficult to absorb most minerals [137]. Therefore, dietary levels of calcium and phosphorus are often higher than actual requirements, resulting in a lower utilization rate and environmental impact due to excess excretion [138].

To ensure eggshell quality, calcium and phosphorus levels in the diet must meet the nutritional requirements of the birds [139]. It is important to note that these requirements may vary depending on the type of quail (Japanese or European), sex, age, and purpose of the farm, whether for the production of eggs for consumption, incubation, or for meat [140].

Several studies are being conducted to establish precise information on the nutritional needs of Japanese quails, aiming to achieve maximum productive performance and maintain health. Table 2 presents the recommended values of calcium and available phosphorus, proposed by different authors for Japanese quails in the laying phase.

Table 2. Recommendations for available calcium (Ca) and phosphorus (P) for Japanese quails.

Age—Weeks	Ca (%)	P (%)	Literature
6–16	3.50	0.45	[141]
6–29	2.00–3.05	-	[142]
6–19	3.51	-	[143]
8–21	2.50	0.31	[144]
45–57	3.50	0.15	[145]
45–57	3.80	-	[146]
7–54	2.50	0.25	[139]
12–42	2.50	0.35	[147]
26–38	2.00	0.31	[148]
21–36	3.10	0.32	[149]
7–20	2.50	0.35	[150]
8–56	2.99	0.31	[42]
6–57	2.0–3.8	0.15–0.45	[124]
20–32	-	0.39–0.44	[151]
9–24	2.68	0.38	[123]
8–56	3.01–3.04	0.31–0.80	[43]

Variations in calcium (Ca) and available phosphorus (P) recommendations for Japanese quails derive from several reasons, such as the source and bioavailability of the minerals, the age of the birds, the efficiency of absorption, and the energy levels of the diets.

8. Calcium (Ca) Absorption

Active absorption and reabsorption of Ca is of great importance in maintaining the homeostasis of this mineral for many physiological functions [152,153]. It is also essential for the formation of skeletal hydroxyapatite and for the mineralization of bones, as well as for satisfying the high Ca requirement in the uterus (where the eggshell is formed) for egg calcification in laying quails [154,155].

In modern commercial strains of laying quails, about 2–3 g of Ca (equivalent to 10% of total body calcium) is transferred daily for deposition in the eggshell [122,156]. The largest source of Ca comes from dietary absorption in the intestine, renal reabsorption, and bone stores [152].

Plasma Ca concentrations are precisely controlled within a narrow range of variation, both intracellular and extracellular, through interactive mechanisms between the parathyroid hormone (PTH), calcitonin (CT), 1,25 dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) and estrogen, and their respective receptors located in the intestine, bones, and kidneys [124]. In response to low blood Ca²⁺ levels, parathyroid cells rapidly release PTH, which stimulates bone resorption by releasing calcium from the bone matrix into the circulation and also by promoting reabsorption in the kidneys. These actions help restore serum Ca²⁺ concentrations. In chronic situations, PTH increases the production of 1,25(OH)₂D₃ to facilitate intestinal Ca²⁺ absorption [157].

Among the various mechanisms aimed at reducing circulating Ca, phytate can be highlighted as one of these, as it has chelating power over several divalent cations, mainly Ca, making it less available [81,158].

There are two mechanisms for the mobilization of Ca that is deposited in the bones. The first is represented by the transfer of ions from the hydroxyapatite crystals to the interstitial fluid, from which the calcium passes into the blood. This mechanism is considered purely physical and takes place mainly in the spongy bones. The second mechanism, which is characterized by having a slower action on the bone tissue, uses the parathyroid hormone (PTH) produced in the parathyroid gland [159]. The PTH increases the number of osteoclasts and the resorption of bone matrix [160], releasing calcium phosphate and increasing calcemia [161] and acts on the kidneys, decreasing phosphorus excretion and stimulating the synthesis of active vitamin D [162]. Parathyroid hormone secretion activity is regulated in response to fluctuations in calcium concentration [124,163].

Calcitonin is another hormone that acts on Ca metabolism to maintain normal levels in blood plasma. It is produced by the parafollicular cells of the thyroid and acts by inhibiting the reabsorption of bone matrix and, consequently, the mobilization of bone Ca. Its secretion is stimulated when Ca levels are high in the blood [164,165].

Modern commercial strains of layers can produce about 300 eggs per year, which require an amount of Ca equivalent to more than 20× their total body weight annually [166,167]. Therefore, layers must absorb a large amount of calcium to support the demand for this production. Epithelial calcium absorption involves two distinct pathways: active transcellular transport of calcium and diffusion via the paracellular pathway [152].

In the mammalian intestine, transcellular calcium transport plays an important role in calcium homeostasis, which is a three-step process comprising the passive entry of calcium into the enterocyte via TRPV6; the cytoplasmic transfer of calcium bound to the protein calbindin-D9k; and, in birds, the analogous protein is calbindin-D28k; and calcium extrusion across the basolateral membrane via Ca²⁺-ATPase (PMCA 1b) and/or Na–Ca exchanger [168,169]. A similar mechanism exists in tissues such as the kidney, uterus, and placenta [152,170–175].

The kidney also plays an essential role in calcium balance by regulating the excretion of calcium from the body. To meet the requirement for eggshell calcification, calcium filtered in the glomerulus is extensively reabsorbed as it passes through the nephrons [172,176].

Egg formation in laying quails is a complex process, which depends on the maturation of the ovum in the ovary, the passage of the mature oocyte through the oviduct via the infundibulum, the addition of albumen in the magnum, the synthesis of the membrane in the isthmus, and deposition of the shell in the uterus. The mineral components of the shell in laying quails are composed mainly of calcium carbonate and, to a lesser extent, of magnesium carbonate and tricalcium phosphate. The initial deposition of minerals occurs in the isthmus where the shell membrane is formed. The calcification of the shell in the uterus takes approximately 20 h, during which time 2 g of Ca is deposited [177].

The function of the different cell types of the uterus and tubular glands is not clearly defined, but they are implicated in the process of Ca secretion. High concentrations of calcium-activated ATPase is located mainly in the microvilli of the uterus tubular cell glands [178]. Although the pathway of calcium absorption and reabsorption is physiologically known, there are no studies in quails that aim to elucidate the absorption, reabsorption, and deposition of calcium in the uterus, including its sites and expression, and they are also scarce in poultry farming in general.

9. Transepithelial Calcium Transport Mediated by TRPV6 and Calbindin-D28K

Epithelia play a fundamental role as linings in various biological compartments, where they create specialized surfaces for essential functions such as protection, secretion, absorption, and reabsorption of substances [179]. For example, the ability of epithelial cells to regulate the absorption and secretion of vital ions, such as calcium, plays a crucial role in maintaining electrolyte balance, thus ensuring the proper processes of several vital functions in the body [172,180,181].

The absorption and reabsorption of calcium in the body occurs through the epithelium of various organs, such as the intestines, kidneys, mammary glands, and placenta. This process is mediated by a complex sequence of events regulated by different factors, such as pH, extracellular calcium concentrations and hormones [172,182]. There are two main pathways described for calcium transport across epithelia: the paracellular pathway, which allows the movement of ions through the spaces between cells, and the transcellular pathway, in which ions are transported through the cytoplasm of epithelial cells. In the transcellular pathway, calcium transport occurs through a process that involves several steps, including the entry of calcium into the cell through the apical membrane, the translocation of calcium through the cytoplasm to the basolateral membrane, and, finally, the release of calcium into the blood [172] (Figure 4).

Calcium entry into epithelial cells occurs through channels located in the apical membrane, known as TRPV5 and TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid), previously called ECaC1 and ECaC2, respectively. These proteins belong to the family of channels known as Transient Receptor Potential Vanilloids, specifically grouped in the Vanilloid subfamily [172], which includes six components, with only TRPV subtypes 5 and 6 having calcium transport capacity [183].

The ion channel TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid Channel Type 6) (Figure 5) functions as an epithelial Ca channel in the intestine, kidney, bone, skin, placenta, and exocrine glands of mammals, which are tissues that are characterized by a high demand for calcium transport [172,184].

TRPV6 is described as having a facilitating effect on Ca entry into epithelial cells, with a significant correlation between TRPV6 expression and Ca transport [154,185], and this ion channel is vitamin D dependent [186]. Observations have led to the suggestion that TRPV6 is an important limiter of calcium entry and homeostasis [154,187]. This ion channel is expressed in the absorption and reabsorption epithelia, that is, in the intestine and kidney; however, there is little information about the expression pattern of TRPV6 in laying hens [152] and none for laying quails.

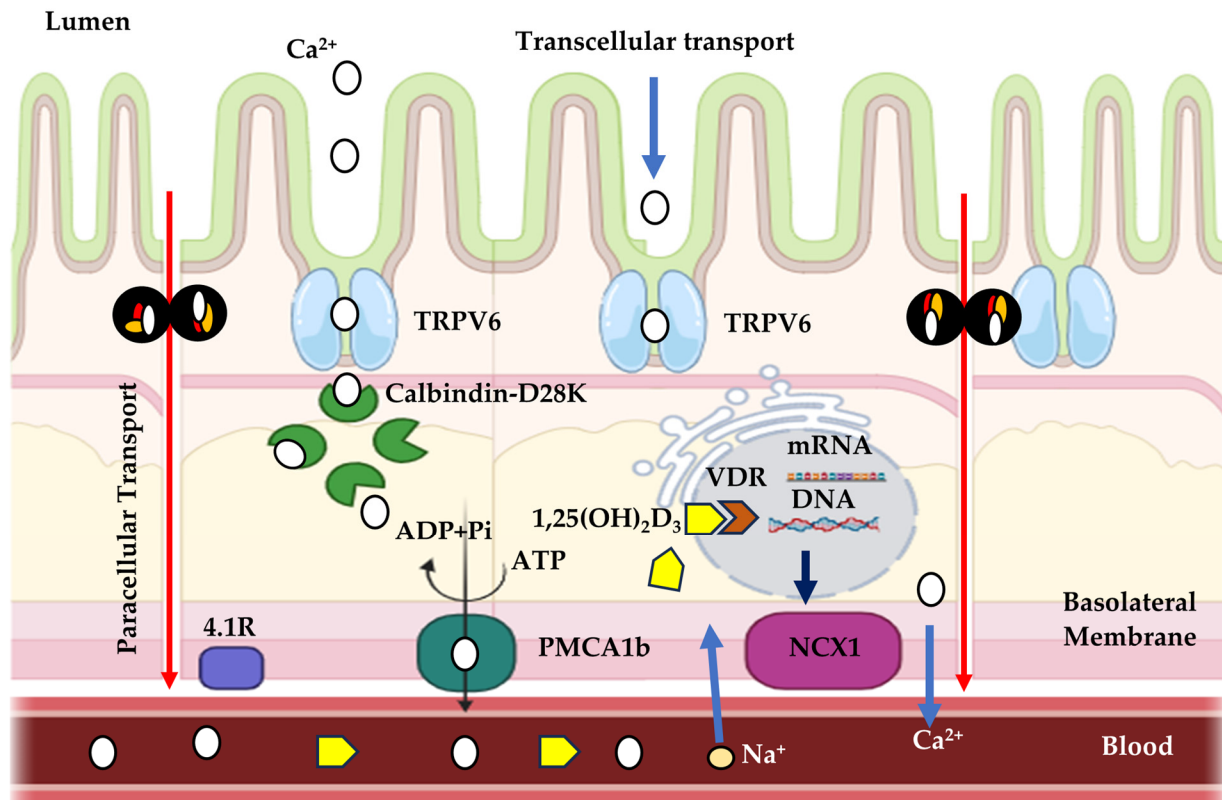


Figure 4. Schematic drawing of transepithelial calcium transport. Integrated model of active epithelial Ca^{2+} transport. Ca^{2+} enters the cell from the luminal side via TRPV6, subsequently binds to calbindin-D28K, and is extruded at the basolateral membrane by a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX1) and/or a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA1b). The active form of vitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] stimulates the individual steps of transcellular Ca^{2+} transport by increasing the expression level of TRPV6, calbindin-D28K and the extrusion systems. TRPV6 (transient receptor potential vanilloid channel type 6); VDR (vitamin D receptor).

Immunohistochemical studies indicated anti-TRPV6 positivity in the apical border of the cells of the duodenum, jejunum, ileum, cecum, and rectum. The positivity was highest in the duodenum and weakest in the rectum and was absent in the crypts and goblet cells. PCR and Western blot also demonstrated the presence of TRPV6 in the aforementioned segments, mainly in the duodenum and jejunum of laying hens [152]. This finding is consistent, since the main sites of calcium absorption in birds are the duodenum and jejunum [188]. In humans, TRPV6 (mRNA) is also most abundant in the duodenum and jejunum, with low levels in the ascending colon, and none in the ileum or distal segments of the large intestine [189].

The significant presence of TRPV6 (mRNA and protein) in the ileum of laying hens [152], contrasts with that found in rats, humans, and sheep [184,189,190], suggesting that the ileum may also have a significant role in intestinal absorption in laying hens. In the kidney of laying hens, TRPV6 (protein) is positive at the apical border of the proximal convoluted tubules, loops of Henle, and distal convoluted tubules. However, it is weaker in the digestive system.

Despite the cited study [152], for other authors [191–193], the presence of TRPV6 in bird tissues, including laying hens or quails, is still uncertain. Considering that TRPV6 is found in the intestinal segments of laying hens, calcium absorption should play a significant role in egg production during laying peak, including shell production, in the uterus. These observations are in line with Yang et al. [152], who describe areas for future studies covering the mechanisms of calcium transfer in laying hens. These studies would include the expression pattern of TRPV6 between laying and non-laying hens, co-expression

with other vitamin-dependent proteins such as calbindin-D28k, and expression in other calcium-transporting tissues such as the avian uterus and bone marrow.

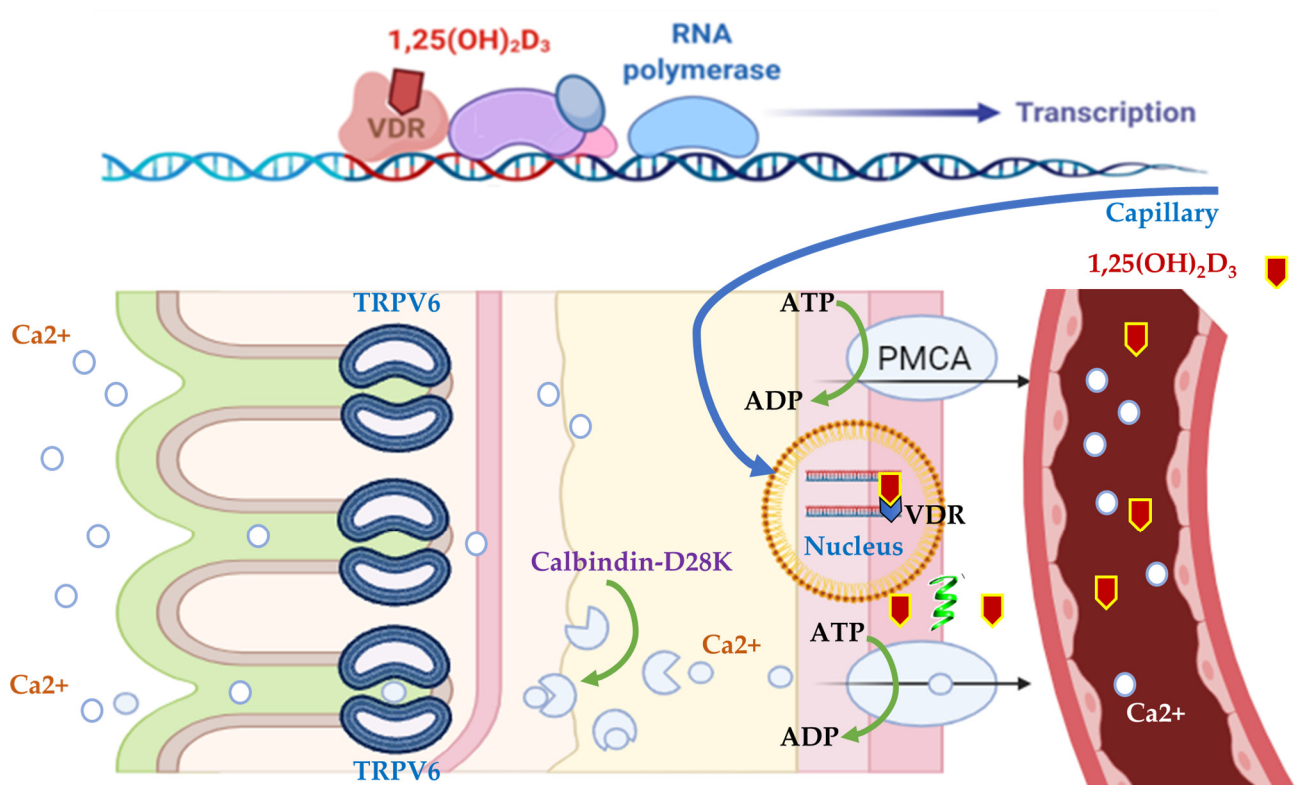


Figure 5. Calcium selective channel TRPV6 and Calbindin-D28K. TRPV6 (transient receptor potential vanilloid channel type 6); VDR (vitamin D receptor).

Thus, Yang et al. [152] propose that the epithelial channel TRPV6 has a crucial function in the absorption and reabsorption of calcium in laying hens. However, further studies are needed to elucidate its action, especially in the uterus and kidney, and there are still no studies of such calcium transporters in quails. Thus, the increase in the expression and positivity of TRPV6 may physiologically prove the better use of calcium after environmental or nutritional changes.

The Calbindin-D28K protein (Figure 5) plays a crucial role in calcium transport: once in the cytoplasm, calcium ions bind with high affinity to calbindin D28K, which acts as a carrier facilitating the diffusion of calcium between the apical and basolateral cytoplasm of cells [3].

Passive calcium absorption involves the diffusion of calcium from the intestinal lumen into the enterocyte, while active absorption is the process in which calcium passes through channels found in the apical membrane of the microvilli of the enterocytes. These then bind to a protein that binds to calcium, Calbindin (vitamin D-induced calcium-binding protein), and diffuses it into the cytoplasm, which is finally extruded by Ca²⁺-ATPase in the basolateral membrane, reaching the vascular system through vessels of the lamina propria [156].

Thus, the potential for active calcium absorption depends on the presence of calbindin in the cytoplasm [194], with its biosynthesis being dependent on circulating levels of vitamin D [195], and on the activity of Ca²⁺-ATPase in the basolateral membrane [196], with the majority of dietary calcium being absorbed by the intestinal segments via the active pathway [197].

Calbindin exists in two main forms, with low molecular weight, one 9kDa protein (Calbindin-D9k) present in mammalian intestines, and another with high molecular weight

with 28kDa (Calbindin-D28k), present in the kidney, brain, intestine, and uterus of birds, and in the kidneys of mammals [198].

The localization of calbindin-D28k in birds was initially described in the intestine of chickens [191] and later in the uterus of laying hens [199] and in the distal portion of the isthmus [200], the latter locations being sites of calcium deposition in the avian oviduct. The synthesis of calbindin-D28k is dependent on vitamin D [199]. However, during the eggshell production cycle, the concentration of calbindin-D28k in the uterus is relatively insensitive to changes in plasma vitamin D levels [201,202].

In the intestine of laying hens, there is positivity (protein) of calbindin-D28k in all segments. It is higher in the duodenum and jejunum, mainly in the apical portions of the villi [156,195], and lower in the ileum. Positivity also occurs in the cecum and colon, to a lesser extent, which indicates that laying hens absorb calcium in both the small and large intestines [156]. Intestinal calbindin-D28k mRNA expression in laying hens is twice as high in laying hens (25 weeks) than in immature hens (11–17 weeks). However, these immature hens do not show positivity (protein) for anti-calbindin-D28k [195]. Despite the mode of action of calbindin-D28k demonstrated in the aforementioned study in laying hens, it is still not known how it behaves in other laying species such as quails, and the raising of quails has been growing in the northeast region of Brazil [30].

It is well established that there is an increased requirement for dietary calcium after sexual maturation in laying hens. This increase is reflected in the elevated expression of calbindin-D28k in the enterocytes of laying hens when there is egg production [195]. The concentration of calbindin-D28k would also be related to the amount of calcium transported to the eggshell in the uterus of laying hens [203], and these levels would be induced by the increase in estrogen. Therefore, calbindin-D28k would modulate the intestinal absorption capacity of calcium [3] and its deposition in the uterus [103,203], influencing the production and quality of the eggshell.

It is known that stress due to high temperatures (30–33 °C) decreases the presence of calbindin-D28k in the ileum, cecum, colon, and uterus of birds, causing the deterioration of eggshell quality under this condition [58]. This finding can be explained by the fact that heat stress reduces the conversion of vitamin D3 into its metabolically active form, 1,25(OH)2D3, which is essential for the absorption and utilization of calcium [103]. In fact, the calcium requirement for laying hens increases under conditions of high environmental temperatures [3]. Therefore, the increase in the expression of and positivity to Calbindin-D28k can also physiologically prove the better use of calcium after a specific diet or environmental treatment.

10. Conclusions

The incorporation of phytase into Japanese quail diets is a promising strategy to optimize poultry production. The ability of the phytase enzyme to release essential nutrients is crucial to improving performance and egg production, allowing quails to reach their maximum potential. In addition, phytases help to reduce the negative effects of heat stress on the functions of epithelial calcium transporters, preserving the digestive and reproductive integrity of laying quails. This ability to counteract the impacts of heat stress further highlights the benefits of phytases in poultry production, contributing to the sustainability and quality of production, in addition to promoting bird welfare. In summary, the addition of phytase to quail diets is an effective and comprehensive approach to increase production efficiency. It is recommended to use a concentration of 1500 FTUs of phytase, as this dosage not only reduces the effects of thermal stress but also improves eggshell thickness and calcium absorption, contributing to maximizing the productive performance of quails. Future research should focus on exploring the synergistic effects of phytase in combination with other nutritional strategies, and how these approaches might further enhance heat stress tolerance in quails.

Author Contributions: Conceptualisation, A.G.R., J.C.d.S.N., L.F.A.d.S., E.G.d.S., J.E.S.R., D.B.C. and C.V.B.d.V.A.; Data curation, A.G.R., R.d.S.S., D.A.d.S., J.C.d.S.N., L.F.A.d.S., E.G.d.S., J.E.S.R., D.B.C., C.V.B.d.V.A., E.P.S. and F.G.P.C.; Investigation, A.G.R., R.d.S.S. and D.A.d.S.; Supervision, E.P.S., F.G.P.C. and R.R.G.; writing—original draft preparation, A.G.R.; writing—review and editing, A.G.R. and R.R.G.; funding acquisition, R.R.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Funding for this research was performed by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Announcement n° 09/2020—Research Productivity Grants, project no. 309318/2020-3 and Announcement 03/2020—Research productivity PROPESQ-PRPG/UFPB Project PVN13248-2020 by through of the Cooperation Agreement by Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Center for Agricultural Sciences (CCA) of the Federal University of Paraíba (UFPB), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Santos, T.C.; Gates, R.S.; Tinôco, I.F.F.; Zolnier, S.; Baêta, F.C. Behavior of Japanese quail in different air velocities and air temperatures. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **2017**, *52*, 344–354. [CrossRef]
2. Truong, L.; Miller, M.R.; Sainz, R.D.; King, A.J. Changes in Japanese quail (*Coturnix japonica*) blood gases and electrolytes in response to multigenerational heat stress. *PLoS Clim.* **2023**, *2*, e0000144. [CrossRef]
3. Moraes, L.R.; Delicato, M.E.A.; Cruz, A.S.; Silva, H.T.F.N.P.; Alves, C.V.B.V.; Campos, D.B.; Saraiva, E.P.; Costa, F.G.P.; Guerra, R.R. Methionine supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0245615. [CrossRef]
4. Niu, Z.Y.; Liu, F.Z.; Yan, Q.L.; Li, W.C. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poult. Sci.* **2009**, *88*, 2101–2107. [CrossRef]
5. Mehaisen, G.M.K.; Ibrahim, R.M.; Desoky, A.A.; Safaa, H.M.; El-Sayed, O.A.; Abass, A.O. The importance of propolis in alleviating the negative physiological effects of heat stress in quail chicks. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186907. [CrossRef]
6. Mehaisen, G.M.K.; Desoky, A.A.; Sakr, O.G.; Sallam, W.; Abass, A.O. Propolis alleviates the negative effects of heat stress on egg production, egg quality, physiological and immunological aspects of laying Japanese quail. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214839. [CrossRef]
7. Miller, D.B.; O’Callaghan, J.P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* **2002**, *51*, 5–10. [CrossRef]
8. Mashaly, M.M.; Hendricks, G.L.; Kalama, M.A.; Gehad, A.E.; Abbas, A.O.; Patterson, P.H. Effect of Heat Stress on Production Parameters and Immune Responses of Commercial Laying Hens. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 889–894. [CrossRef] [PubMed]
9. Sahin, K.; Sahin, N.; Onderci, M. Vitamin E supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, egg quality, digestibility of nutrients and egg yolk mineral concentrations of Japanese quails. *Res. Vet. Sci.* **2002**, *73*, 307–312. [CrossRef]
10. Vercese, F.; Garcia, E.A.; Sartori, J.R.; Silva, A.P.; Faitarone, A.B.G.; Berto, D.A.; Molino, A.B.; Pelícia, K. Performance and egg quality of Japanese quails submitted to cyclic heat stress. *Braz. J. Poult. Sci.* **2012**, *14*, 37–41. [CrossRef]
11. Akdemir, F.; Sahin, N.; Orhan, C.; Tuzcu, M.; Sahin, K.; Hayirli, A. Chromium-histidinate ameliorates productivity in heat-stressed Japanese quails through reducing oxidative stress and inhibiting heat-shock protein expression. *Br. Poult. Sci.* **2015**, *56*, 247–254. [CrossRef] [PubMed]
12. Patra, T.; Pati, P.K.; Mohapatra, A.K. Study on carcass quality of coloured broiler chicks supplemented with vitamin E and C during summer stress. *SAARC Agric. Inf. Cent. SAIC* **2011**, *9*, 123–132. Available online: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123050083> (accessed on 2 January 2024).
13. Deng, W.; Dong, X.F.; Tong, J.M.; Zhang, Q. The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 575–582. [CrossRef] [PubMed]
14. Sandikci, M.; Eren, U.; Onol, A.G.; Kum, S. The effect of heat stress and the use of *Saccharomyces cerevisiae* or (and) bacitracin zinc against heat stress on the intestinal mucosa in quails. *Rev. De Med. Vet.* **2004**, *11*, 552–556. Available online: https://www.researchgate.net/publication/289759420_The_effect_of_heat_stress_and_the_use_of_Saccharomyces_cerevisiae_or_and_bacitracin_zinc_against_heat_stress_on_the_intestinal_mucosa_in_quails (accessed on 2 April 2024).

15. Sahin, N.; Orhan, C.; Tuzcu, M.; Sahin, K.; Kucuk, O. The Effects of Tomato Powder Supplementation on Performance and Lipid Peroxidation in Quail. *Poult. Sci.* **2008**, *87*, 276–283. [\[CrossRef\]](#)
16. Akdemir, F.; Köseman, A.; Şeker, I. Alchemilla vulgaris effects on egg production and quality expressed by heat-stressed quail during the late laying period. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2019**, *49*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
17. Farias, M.R.S.; Leite, S.C.B.; Silva, H.P.; Pacheco, D.B.; Alves, G.C.; Abreu, C.G.; Freitas, E.R. Superdosing Phytases in the Diets of Light Laying Hens: Productive Performance and Bone Quality. *Braz. J. Poult. Sci.* **2021**, *23*, 001–010. [\[CrossRef\]](#)
18. Hirvonen, J.; Liljavirta, J.; Saarinen, M.T.; Lehtinen, M.J.; Ahonen, I.; Nurminen, P.I. Effect of Phytase on in Vitro Hydrolysis of Phytate and the Formation of myo-Inositol Phosphate Esters in Various Feed Materials. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 11396–11402. [\[CrossRef\]](#)
19. Sena, T.L.; Leite, S.C.B.; Vasconcelos, A.M.; Bezerra, M.M.R.; Abreu, C.G.; Farias, M.R.S.; Silveira, R.M.F. Does dietary supplementation with phytases affect the thermoregulatory and behavioral responses of pullets in a tropical environment? *J. Therm. Biol.* **2020**, *88*, 102499. [\[CrossRef\]](#)
20. Maynard, C.J.; Maynard, C.W.; Mullenix, G.J.; Ramser, A.; Greene, E.S.; Bedford, M.R.; Dridi, S. Impact of Phytase Supplementation on Meat Quality of Heat-Stressed Broilers. *Animals* **2023**, *13*, 2043. [\[CrossRef\]](#)
21. Farias, M.R.S.; Leite, S.C.B.; Vasconcelos, A.M.; Silva, T.A.G.; Leitão, A.M.F.; Sena, T.L.; Pacheco, D.B.; Abreu, C.G.; Silveira, R.M.F. Thermoregulatory, behavioral and productive responses of laying hens supplemented with different types and dosages of phytases raised in a hot environment: An integrative approach. *J. Therm. Biol.* **2020**, *94*, 102773. [\[CrossRef\]](#)
22. Pirgozliev, V.; Bedford, M.R.; Acamovic, T.; Allymehr, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. *Br. Poult. Sci.* **2011**, *52*, 245–254. [\[CrossRef\]](#)
23. Martínez-Vallespín, B.; Männer, K.; Ader, P.; Zentek, J. Evaluation of high doses of phytase in a low-phosphorus diet in comparison to a phytate-free diet on performance, apparent ileal digestibility of nutrients, bone mineralization, intestinal morphology, and immune traits in 21-day-old broiler chickens. *Animals* **2022**, *12*, 1955. [\[CrossRef\]](#)
24. Rojas, I.Y.M.; González, E.A.; Menocal, J.A.; Santos, T.T.; Arguello, J.R.; Coello, C.L. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum-soybean-meal-based diets. *J. Appl. Anim. Res.* **2017**, *46*, 314–321. [\[CrossRef\]](#)
25. Manobhavan, M.; Elangovan, A.V.; Sridhar, M.; Shet, D.; Ajith, S.; Pal, D.T.; Gowda, N.K.S. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn-soya-based diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2016**, *100*, 93–100. [\[CrossRef\]](#)
26. Pinto, R.; Ferreira, A.S.; Albino, L.F.T.; Gomes, P.C.; Vargas Júnior, J.G. Protein and Energy Levels for Laying Japanese Quails. *Rev. Bras. De Zootec.* **2002**, *31*, 1761–1770. [\[CrossRef\]](#)
27. Vogado, G.M.S.; Silva, L.P. *Características Anatômicas e Fatores Genéticos Ligados ao Desenvolvimento Reprodutivo de Codornas de Corte*; Agron Science: Cuddalore, India, 2023; pp. 119–133. [\[CrossRef\]](#)
28. Lukanov, H.; Pavlova, I. Domestication changes in Japanese quail (*Coturnix japonica*): A review. *Worlds Poult. Sci. J.* **2020**, *76*, 787–801. [\[CrossRef\]](#)
29. Lukanov, H. Domestic quail (*Coturnix japonica domestica*), is there such farm animal? *Worlds Poult. Sci. J.* **2019**, *75*, 547–558. [\[CrossRef\]](#)
30. Pastore, S.M.; Oliveira, W.P.; Muniz, J.C.L. Panorama Da Coturnicultura No Brasil. *Rev. Eletrônica Nutr.* **2012**, *9*, 2041–2049. Available online: <https://portalidea.com.br/cursos/25e421f08de4aab6d494d4a76b957d11.pdf> (accessed on 2 March 2024).
31. Almeida, T.J.O.; Araújo, V.V.; Silva, A.V.; Silva, R.F.; Santos, N.A.; Santana, M.D.; Oliveira, V.P. Evolução Da Produção De Codornas Para Abate E Postura No Brasil. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão—JEPEX—UFRPE: Recife, Anais 2013. Available online: <https://portalidea.com.br/cursos/6409d8df3ed7101311dc5da38592c83c.pdf> (accessed on 15 June 2024).
32. Silva, J.H.V.; Jordão Filho, J.; Costa, F.G.P.; Lacerda, P.B.; Vargas, D.G.V.; Lima, M.R. Exigências nutricionais de codornas. *Rev. Bras. De Saúde E Produção Anim.* **2012**, *13*, 775–790. Available online: <https://www.scielo.br/j/rbspa/a/kjDrRVLb6cMr7p6hskmZKzj/?format=pdf&lang=pt> (accessed on 16 June 2024).
33. Vieira, S.S. Desempenho e Qualidade Dos Ovos de Codornas Japonesas (*Coturnix japonica*) Alimentadas com Dietas Contendo Diferentes Níveis Óleo de Palma. Master's Thesis, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Amazônia, Brasil. 2014.
34. Nasar, A.; Rahman, A.; Hoque, N.; Kumar Talukder, A.; Das, Z.C. A survey of Japanese quail (*Coturnix japonica*) farming in selected areas of Bangladesh. *Vet. World* **2016**, *9*, 940–947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Matos Júnior, J.J.L.; Furtado, D.A.; Ribeiro, N.L.; Marques, J.I.; Leite, P.G.; Nascimento, J.W.B.; Rodrigues, V.P.; Lopes Neto, J.P.; Rodrigues, L.R.; Santos, S.G.C.G.; et al. Productive performance, egg quality and the morphometry of the organs of Japanese quails (*Coturnix japonica*) kept at different temperatures. *Food Sci. Technol.* **2023**, *43*, 117822. [\[CrossRef\]](#)
36. Sarcinelli, M.F.; Venturini, K.S.; Silva, L.C. Características dos Ovos. In *Boletim Técnico, Universidade Federal do Espírito Santo*; Universidade Federal do Espírito Santo: Vitoria, Brazil, 2007. Available online: https://www.agais.com/telomc/b00707_caracteristicas_ovos.pdf (accessed on 3 June 2024).
37. Carvalho, F.B.; Stringhini, J.H.; Jardim Filho, R.M.; Leandro, N.S.M.; Café, M.B.; Deus, H.A.S.B. Qualidade interna e de casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. *Ciência Anim. Bras.* **2007**, *8*, 25–30. Available online: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/1155> (accessed on 4 July 2024).
38. Mota, A.S.B.; Lima, P.M.S.; Silva, D.S.; Abreu, V.K.G.; Freitas, E.R.; Pereira, A.L.F. Internal quality of eggs coated with cassava and yam starches. *Rev. Bras. De Ciências Agrárias* **2017**, *12*, 47–50. [\[CrossRef\]](#)

39. National Academics Press (NRC). *Nutrient Requirements of Poultry*, 9th ed.; National Academics Press: Washington, DC, USA, 1994. Available online: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=bbV1FUqRcM0C&oi=fnd&pg=PT13&dq=NRC+1994+Nutrient+Requirements+of+Poultry.+9th+ed.+National+Academics+Press,+Washington&ots=IleM4AkqTs&sig=2Ll0iW3NGbzHsQc19UoHD17wtXm#v=onepage&q&f=false> (accessed on 5 July 2024).
40. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). *Alimentação dos Animais Monogástricos: Suínos, Coelhos e Aves*, 2nd ed.; Roca: São Paulo, Brazil, 1999; 245p.
41. Silva, J.H.V.; Costa, F.G.P. *Tabelas para Codornas Japonesas e Europeias*, 2nd ed.; FUNEP: Jaboticabal, Brazil, 2009; 107p.
42. Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Hannas, M.I.; Donzele, J.L.; Sakomura, N.K.; Perazzo, F.G.; Brito, C.O. Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements, 4th ed. In Proceedings of the IV International Symposium on Nutritional Requirements of Poultry and Swine, Viçosa, Brazil, 30 March 2017.
43. Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Calderano, A.A.; Hannas, M.I.; Donzele, J.L.; Sakomura, N.K.; Perazzo, F.G.; Brito, C.O. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos*, 5th ed.; Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brazil, 2024; 576p.
44. Silva, R.C.; Trocas de Calor e Desempenho de Codornas Japonesas Confinadas em Ambiente Termoneutro e Sob Estresse Térmico. Tese (Doutor em Engenharia Agrícola), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande—Paraíba, Brasil. 2017. Available online: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/28065> (accessed on 4 July 2024).
45. Kim, D.H.; Kim, Y.B.; Lee, S.H.; Lee, Y.K.; Lee, S.D.; Lee, K.W. Identical thermal stress coupled with different temperature and humidity combinations affects nutrient digestibility and gut metabolites of laying hens. *Braz. J. Anim. Sci.* **2023**, *52*, e20220067. [CrossRef]
46. Alagawany, M.; Farag, M.R.; Abd El-Hack, M.E.; Patra, A. Heat stress: Effects on productive and reproductive performance of quail. *Worlds Poult. Sci. J.* **2017**, *73*, 747–756. [CrossRef]
47. Teyssier, J.R.; Brugaletta, G.; Sirri, F.; Dridi, S.; Samuel, J.; Rochell, S.J. A review of heat stress in chickens. Part II: Insights into protein and energy utilization and feeding. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 943612. [CrossRef]
48. Wasti, S.; Sah, N.; Mishra, B. Impact of Heat Stress on Poultry Health and Performances, and Potential Mitigation Strategies. *Animals* **2020**, *10*, 1266. [CrossRef]
49. Linsley, J.G.; Burger, R.E. Respiratory and cardiovascular responses in the hyperthermic domestic cock. *Poult. Sci.* **1964**, *43*, 291–305. [CrossRef]
50. Vercese, F. Efeito da Temperatura Sobre o Desempenho e a Qualidade dos Ovos de Codornas Japonesas. Master's Dissertation, Graduate Program in Animal Science at São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil, 2010; 70p. Available online: <https://www.fmvz.unesp.br/Home/ensino/pos-graduacao768/zootecnia/dissertacoes/teses/francine-vercese.pdf> (accessed on 2 May 2024).
51. Furlan, R.L.; Macari, M.; Moraes, V.M.B.; Malheiros, R.D.; Malheiros, E.B.; Secato, E.R. Alterações hematológicas e gasométricas em diferentes linhagens de frangos de corte submetidos ao estresse calórico agudo. *Rev. Bras. De Ciência Avícola* **1999**, *1*, 77–84.
52. Ruzal, M.; Shinder, D.; Malka, I.; Yahav, S. Ventilation plays an important role in hens' egg production at high ambient temperature. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 856–862. [CrossRef] [PubMed]
53. Cruvinel, J.M.; Urayama, P.M.G.; Santos, T.S.; Denadai, J.C.; Muro, E.M.; Dornelas, L.C.; Pasquali, G.A.M.; Contin Neto, A.C.; Zanetti, L.H.; Ferreira Netto, R.G.; et al. Different dietary electrolyte balance values on performance, egg, and bone quality of Japanese quail (*Coturnix japonica*) under heat stress. *Trop. Anim. Health Prod.* **2020**, *53*, 17. [CrossRef] [PubMed]
54. Abdulkadir, A.; Reddy, D. A scoping review of the impact of heat stress on the organs of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J. Basic Appl. Zool.* **2023**, *84*, 8. [CrossRef]
55. Lesson, S.; Summers, J.D. *Commercial Poultry Nutrition*; Nottingham University Press: Nottingham, UK, 1991; 283p.
56. Mongin, P. Role of acid-base balance in the physiology of egg-shell formation. *Worlds Poult. Sci. J.* **1968**, *24*, 200–230. [CrossRef]
57. Campos, E.J. *Avicultura: Razões Fatos e Divergências*; FEPMVZ: Belo Horizonte, Brazil, 2000; 311p.
58. Ebeid, T.A.; Suzuki, T.; Sugiyama, T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 2282–2287. [CrossRef]
59. Sahin, K.; Sahin, N.; Kucuk, O.; Hayirli, A.; Prasad, A.S. Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: A review. *Poult. Sci.* **2009**, *88*, 2176–2183. [CrossRef]
60. Melo, A.S.; Fernandes, R.T.V.; Marinho, J.B.M.; Arruda, A.M.V.; Figueirêdo, L.C.; Fernandes, R.T.V. Relação temperatura e nutrição sobre o desempenho de galinhas poedeiras. *PUBVET* **2016**, *10*, 855–860. [CrossRef]
61. Kumar, S.; Anand, R. Effect of Germination and Temperature on Phytic Acid Content of Cereals. *Int. J. Res. Agric. Sci.* **2021**, *8*, 1–13. Available online: https://ijras.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJRAS_932_FINAL.pdf (accessed on 2 August 2024).
62. Kim, D.H.; Lee, Y.K.; Lee, S.D.; Kim, S.H.; Lee, S.R.; Lee, H.G.; Lee, K.W. Changes in Production Parameters, Egg Qualities, Fecal Volatile Fatty Acids, Nutrient Digestibility, and Plasma Parameters in Laying Hens Exposed to Ambient Temperature. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 412. [CrossRef]
63. Lehrfeld, J. High-performance Liquid Chromatography Analysis of Phytic Acid on a pH-stable, Macroporous Polymer Column. *Cereal Chemistry* **1989**, *66*, 510–515. Available online: https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1989/Documents/66_510.pdf (accessed on 3 August 2024).

64. Bloot, A.P.M.; Kalschne, D.L.; Amaral, J.A.S.; Baraldi, I.J.; Canan, C. A Review of Phytic Acid Sources, Obtention, and Applications. *Food Rev. Int.* **2021**, *39*, 73–92. [\[CrossRef\]](#)
65. Lolas, G.; Palamidis, N.; Markakis, P. Phytic Acid Total Phosphorus Relationship Relationship in Barley, Oats, Soybeans and Wheat. *Cereal Chem.* **1976**, *53*, 867–871. Available online: https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1976/Documents/chem53_867.pdf (accessed on 3 August 2024).
66. Stein, H.H. Analyzed Values for P and Phytate in Feed Ingredients. Monogastric Nutrition Laboratory. 2023. Available online: <https://nutrition.ansci.illinois.edu/node/1753> (accessed on 8 August 2024).
67. Ravindran, S.; Ravindran, V.; Sivalogan, G. Total and Phytate Phosphorus Contents of Various Foods and Feedstuffs of Plant Origin. *Food Chem.* **1994**, *50*, 133–136. [\[CrossRef\]](#)
68. Frossard, E.; Bucher, M.; Mächler, F.; Mozafar, A.; Hurrell, R. Potential for Increasing the Content and Bioavailability of Fe, Zn and Ca in Plants for Human Nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 861–879. [\[CrossRef\]](#)
69. Banaszkievicz, T. Nutritional Value of Soybean Meal. In *Soybean and Nutrition*; InTech Open: London, UK, 2011. [\[CrossRef\]](#)
70. Kasim, B.; Edwards, H.M. The Analysis of Inositol Phosphate Forms in Feed Ingredients. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
71. Canan, C.; Cruz, F.T.L.; Delarozza, F.; Casagrande, R.; Sarmento, C.P.M.; Shimokomaki, M.; Ida, E.I. Studies on the Extraction and Purification of Phytic Acid from Rice Bran. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 1057–1063. [\[CrossRef\]](#)
72. García-Estapa, R.; García-Estapa, R.M.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Phytic Acid Content in Milled Cereal Products and Breads. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 217–221. [\[CrossRef\]](#)
73. Hu, Y.X.; Van Harn, J.; Hendriks, W.H.; Van Baal, J.; Dijkslag, M.A.; Van Krimpen, M.M.; Bikker, P. Low-calcium diets increase duodenal mRNA expression of calcium and phosphorus transporters and claudins but compromise growth performance irrespective of microbial phytase inclusion in broilers. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 101488. [\[CrossRef\]](#)
74. Figueirêdo, A.V.; Fialho, E.T.; Vitti, D.M.S.S.; Lopes, J.B.; Silva Filho, J.C.; Teixeira, A.S.; Lima, J.A.F. Ação da Fitase sobre a Disponibilidade Biológica do Fósforo, por Intermédio da Técnica de Diluição Isotópica, em Dietas com Farelo de Arroz Integral para Suínos. *Rev. Bras. De Zootec.* **2000**, *29*, 177–182. [\[CrossRef\]](#)
75. Payne, R.L.; Laverne, T.K.; Southern, L.L. A comparison of two sources of phytase in liquid and dry forms in broilers. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 265–272. [\[CrossRef\]](#)
76. Woyengo, T.A.; Nyachoti, C.M. Review: Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. *Can. J. Anim. Sci.* **2011**, *91*, 177–192. [\[CrossRef\]](#)
77. Costello, A.J.R.; Glonek, T.; Myers, T.C. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance-pH Titrations of Myo-Inositol Hexaphosphate. *Carbohydr. Res.* **1976**, *46*, 159–171. [\[CrossRef\]](#)
78. Vasconcelos, D.M. Diferentes Níveis Nutricionais e de Fitase Nas Dietas para Codornas Japonesas. D. Master's Dissertation, Center for Agricultural Sciences at the Federal University of Paraíba (UFPB), Areia, Paraíba, Brazil, 2018. Available online: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/14997/1/DZ329.pdf> (accessed on 18 July 2024).
79. Gautier, A.E.; Walk, C.L.; Dilger, R.N. Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol. *Poult. Sci.* **2017**, *97*, 211–218. [\[CrossRef\]](#)
80. Alves, N.M.; Guimarães, L.H.S.; Piccoli, R.H.; Cardoso, P.G. Production and Partial Characterization of an Extracellular Phytase Produced by *Mucodora* sp. under Submerged Fermentation. *Adv. Microbiol.* **2016**, *6*, 23–32. [\[CrossRef\]](#)
81. Rezaei-pour, V.; Barsalani, A.; Abdollahpour, R. Effects of phytase supplementation on growth performance, jejunum morphology, liver health, and serum metabolites of Japanese quails fed sesame (*Sesamum indicum*) meal-based diets containing graded levels of protein. *Trop. Anim. Health Prod.* **2016**, *48*, 1141–1146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Lelis, G.R.; Albino, L.F.T.; Silva, C.R.; Rostagno, H.S.; Gomes, P.G.; Borsatto, C.G. Suplementação dietética de fitase sobre o metabolismo de nutrientes de frangos de corte. *Rev. Bras. De Zootec.* **2010**, *39*, 1768–1773. [\[CrossRef\]](#)
83. Jatuwong, K.; Suwannarach, N.; Kumla, J.; Penkhrue, W.; Kakumyan, P.; Lumyong, S. Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 188. [\[CrossRef\]](#)
84. Sena, T.L.; Leite, S.C.B.; Farias, M.R.S.; Abreu, C.G.; Freitas, E.R.; Costa, A.C. Phytase Superdosing in the Diet of Lightweight Replacement Pullets: Performance, Organ Biometry and Bone Characteristics. *Braz. J. Poult. Sci.* **2022**, *22*, 001–008. [\[CrossRef\]](#)
85. Kriseldi, R.; Walk, C.L.; Bedford, M.R.; Dozier, W.A. Inositol and gradient phytase supplementation in broiler diets during a 6-week production period: 2. Effects on phytate degradation and inositol liberation in gizzard and ileal digesta contents. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 100899. [\[CrossRef\]](#)
86. Vats, P.; Banerjee, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. *Enzym. Microb. Technol.* **2004**, *35*, 3–14. [\[CrossRef\]](#)
87. Sato, V.S.; Jorge, J.A.; Oliveira, W.P.; Souza, C.R.F.; Guimarães, L.H.S. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: Characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *24*, 177–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Dailin, D.J.; Hanapi, S.Z.; Elsayed, E.A.; Sukmawati, D.; Azelee, N.I.W.; Eyahmalay, J.; Siwapiragam, V.; El Enshasy, H. Fungal Phytases: Biotechnological Applications in Food and Feed Industries. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*; Springer Nature: Berlin, Germany, 2019; pp. 65–99. [\[CrossRef\]](#)

89. Greiner, R.; Konietzny, U. Phytases: Biochemistry, Enzymology and Characteristics Relevant to Animal Feed Use. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*; Bedford, M.R., Partridge, G.G., Eds.; CAB International Publishing: Oxfordshire, UK, 2010; pp. 96–128. Available online: https://www.researchgate.net/publication/286044581_Phytases_Biochemistry_Enzymology_and_Characteristics_Relevant_to_Animal_Feed_Use (accessed on 20 August 2024).
90. Bhavsar, K.; Khire, J.M. Current research and future perspectives of phytase bioprocessing. *R. Soc. Chem. Adv.* **2014**, *4*, 26677–26691. [CrossRef]
91. Santos, K.O.; Costa-Filho, J.; Riet, J.; Spagnol, K.L.; Nornberg, B.F.; Kütter, M.T.; Tesser, M.B.; Marins, L.F. Probiotic expressing heterologous phytase improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *93*, 652–658. [CrossRef]
92. Greiner, R.; Alminger, M.L.; Carlsson, N.G. Stereospecificity of *myo*-Inositol Hexakisphosphate Dephosphorylation by a Phytate-Degrading Enzyme of Baker's Yeast. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2228–2233. [CrossRef]
93. Naves, L.P.; Corrêa, A.D.; Bertechini, A.G.; Gomide, E.M.; Santos, C.D. Effect of pH and Temperature on the Activity of Phytase Products Used in Broiler Nutrition. *Braz. J. Poult. Sci.* **2012**, *14*, 159–232. [CrossRef]
94. Delmaschio, I.B. Produção de Fitases por Fermentação em Estado Sólido e Imobilização das Enzimas por Spray Drying. Master's Dissertation, Graduate Program in Microbiology, Concentration Area in Industrial and Applied Microbiology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences at São Paulo State University (UNESP) 'Júlio de Mesquita Filho', Campus São José, do Rio Preto, Brazil, 2014; 115p. Available online: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNSP_5ea0a9a9549bebefae1fbf3090e0ce6 (accessed on 2 April 2024).
95. Nezhad, N.G.; Rahman, R.N.Z.R.A.; Normi, Y.M.; Oslan, S.N.; Shari, F.M.; Leow, T.C. Integrative Structural and Computational Biology of Phytases for the Animal Feed Industry. *Catalysts* **2020**, *10*, 844. [CrossRef]
96. Dallmann, H.M.; Avila, V.S.; Krabbe, E.L.; Surek, D.; Bedendo, G.C.; Toledo, T.S.; Dallmann, P.R.; Roll, A.A.P.; Roll, V.F.B.; Rutz, F. Different phytase levels and energy densities in broiler diets on performance, nutrient digestibility, and bone integrity from 28 to 35 days of age. *Arq. Bras. De Med. Veterinária E Zootec.* **2023**, *75*, 280–292. [CrossRef]
97. Cowieson, A.J.; Wilcock, P.; Bedford, M.R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *Worlds Poult. Sci. J.* **2011**, *67*, 225–236. [CrossRef]
98. Nelson, T.S.; Shieh, T.R.; Wodzinski, R.J.; Ware, J.H. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.* **1971**, *101*, 1289–1294. [CrossRef]
99. Walk, C.L.; Bedford, M.R.; Santos, T.S.; Paiva, D.; Bradley, J.R.; Wlodecki, H.; Honaker, C.; McElroy, A.P. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 719–725. [CrossRef]
100. Fernandes, J.I.M.; Horn, D.; Ronconi, E.J.; Buzim, R.; Lima, F.K.; Pazdiora, D.A. Effects of Phytase Superdosing on Digestibility and Bone Integrity of Broilers. *J. Appl. Poult. Res.* **2019**, *28*, 390–398. [CrossRef]
101. Leyva-Jimenez, H.; Alsadwi, A.M.; Gardner, K.; Voltura, E.; Bailey, C.A. Evaluation of high dietary phytase supplementation on performance, bone mineralization, and apparent ileal digestible energy of growing broilers. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 811–819. [CrossRef] [PubMed]
102. Kim, J.H.; Pitargue, F.M.; Jung, H.; Han, G.P.; Choi, H.S.; Kil, D.Y. Effect of superdosing phytase on productive performance and egg quality in laying hens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2017**, *30*, 994–998. [CrossRef]
103. Ribeiro, A.G.; Silva, R.S.; Costa, F.S.; Silva, E.G.; Santos Ribeiro, J.E.; Saraiva, E.P.; Costa, F.G.P.; Guerra, R.R. Phytase super-dosing modulates bone parameters and the concentration of the calcium epithelial carrier Calbindin-D28k in quails (*Coturnix japonica*) under thermal stress. *Anim. Prod. Sci.* **2024**, *64*, AN24057. [CrossRef]
104. Saeed, M.; Abbas, G.; Alagawany, M.; Ali Kamboh, A.; Abd El-Hack, M.E.; Khafaga, A.F.; Chao, S. Heat stress management in poultry farms: A comprehensive overview. *J. Therm. Biol.* **2019**, *84*, 414–425. [CrossRef]
105. Farag, M.R.; Alagawany, M. Physiological alterations of poultry to the high environmental temperature. *J. Therm. Biol.* **2018**, *76*, 101–106. [CrossRef] [PubMed]
106. Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H.; Partridge, G. Phytase in non ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *95*, 878–896. [CrossRef]
107. Freeland-Graves, J.H.; Sanjeevi, N.; Lee, J.J. Global perspectives on trace element requirements. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, *31*, 135–141. [CrossRef]
108. Borges, G.C.S. Peroxidação Lipídica, Desempenho e Características de Carcaça de Frangos de Corte Estressados Pelo Calor e Suplementados com Zinco e Selênio. Master's Dissertation, School of Veterinary Medicine, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, 2008; 61p. Available online: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12987> (accessed on 6 July 2024).
109. Hu, P.; Li, K.; Peng, X.; Yao, T.; Zhu, C.; Gu, H.; Liu, H.-Y.; Sun, M.; Hu, Y.; Ennab, W.; et al. Zinc intake ameliorates intestinal morphology and oxidative stress of broiler chickens under heat stress. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1308907. [CrossRef]
110. Kazim, S.; Omer, K. Zinc Supplementation Alleviates Heat Stress in Laying Japanese Quail. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2808–2811. [CrossRef]
111. Prasad, A.S.; Kucuk, O. Zinc in cancer prevention. *Cancer Metastasis Rev.* **2002**, *21*, 291–295. [CrossRef] [PubMed]
112. Ruttkay-Nedecky, B.; Nejdli, L.; Gumulec, J.; Zitka, O.; Masarik, M.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Adam, V.; Kizek, R. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6044–6066. [CrossRef] [PubMed]

113. Zhang, Y.N.; Zhang, H.J.; Wang, J.; Yue, H.Y.; Qi, X.L.; Wu, S.G.; Qi, G.H. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic zinc on carbonic anhydrase activity in eggshell formation and quality of aged laying hens. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 2176–2183. [CrossRef]
114. Benesch, R.; Barron, N.S.; Mawson, C.A. Carbonic anhydrase, sulphonamides and shell formation in the domestic fowl. *Nature* **1944**, *153*, 138–139. [CrossRef]
115. Nys, Y.; Hincke, M.; Arias, J.; Garcia-Ruiz, J.; Solomon, S. Avian eggshell mineralization. *Poult. Avian Biol. Rev.* **1999**, *10*, 143–166. Available online: https://www.researchgate.net/profile/Yves-Nys/publication/279562431_Avian_Eggshell_Mineralization/links/5630e38208ae0530378cf614/Avian-Eggshell-Mineralization.pdf (accessed on 21 July 2024).
116. Holm, L.; Blomqvist, A.; Brandt, I.; Brunström, B.; Ridderstråle, Y.; Berg, C. Embryonic exposure to o, p'-DDT causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 2787–2793. [CrossRef]
117. Mohebbifar, A.; Torki, M.; Ghasemi, H.A. Effect of phytase supplementation of diets with different levels of rice bran and non-phytate phosphorus on productive performance, egg quality traits, leukocytes profile and serum lipids of laying hens reared indoor under high environmental temperatures. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2015**, *207*, 222–233. [CrossRef]
118. Hezaveh, M.S.S.; Ghasemi, H.A.; Hajkhodadadi, I.; Moradi, M.H. Single and combined effects of phytase and citric acid on growth performance, nutrient digestibility, bone characteristics, intestinal morphology, and blood components in meat-type quails fed low-phosphorous diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *269*, 114677. [CrossRef]
119. Lima, H.J.D.A.; Barreto, S.L.T.; Donzele, J.L.; Valeriano, M.H.; Vieira, P.A.F.; Costa, C.H.R. Dietary phytase levels on performance and egg quality of Japanese quails. *Rev. Bras. De Zootec.* **2011**, *40*, 129–134. [CrossRef]
120. Euzébio, T.C.; Santos, T.C. Importance of Research on the Nutritional Requirements of Vitamins and Minerals for Quail Farming. *nutriNews* 2021. Available online: <https://nutrinews.com/pt-br/importancia-das-pesquisas-sobre-as-exigencias-nutricionais-de-vitaminas-e-minerais-para-a-coturnicultura/> (accessed on 20 July 2024).
121. Gouveia, A.B.V.S.; Paulo, L.M.; Dias, A.G.F.; Batista, J.M.; Brasileiro, J.C.L.; Minafra, C.S.; Stringhini, J.H. Fitase na nutrição de aves de corte e postura: Revisão de literatura. *II Congresso Brasileiro de Produção Animal e Vegetal: Produção Anim. E Veg. Inovações E Atual.* **2022**, *2*, 984. [CrossRef]
122. Ribeiro, C.L.N.; Barreto, S.L.T.; Reis, R.S.; Muniz, J.C.L.; Viana, G.S.; Ribeiro Junior, V.; Mendonça, M.O.; Ferreira, R.C.; DeGroot, A.A. The Effect of Calcium and Available Phosphorus Levels on Performance, Egg Quality and Bone Characteristics of Japanese Quails at End of the Egg-Production Phase. *Braz. J. Poult. Sci.* **2016**, *18*, 033–040. [CrossRef]
123. Stanquevis, C.E.; Furlan, A.C.; Marcato, S.M.; Oliveira-Bruxel, T.M.; Perine, T.P.; Finco, E.M.; Grecco, E.T.; Benites, M.I.; Zancanela, V.T. Calcium and available phosphorus requirements of Japanese quails in early egg-laying stage. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 147–158. [CrossRef] [PubMed]
124. Souza, C.S.; Barreto, S.L.T.; Vieites, F.M.; Calderano, A.A.; Moraes, G.H.K.; Oliveira, M.G.A. Cálcio e fósforo na nutrição de codornas japonesas em postura. *Sci. Anim. Health* **2017**, *5*, 260–281. Available online: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/veterinaria/article/view/9166/8350> (accessed on 20 July 2024).
125. Lautrou, M.; Pomar, C.; Dourmad, J.-Y.; Narcy, A.; Schmidely, P.; Létourneau-Montminy, M.P. Phosphorus and calcium requirements for bone mineralisation of growing pigs predicted by mechanistic modelling. *Animal* **2020**, *14*, s313–s322. [CrossRef]
126. 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. [CrossRef]
127. Pelicia, K.; Garcia, E.A.; Faltarone, A.B.G.; Silva, A.P.; Berto, D.A.; Molino, A.B.; Vercese, F. Calcium and Available Phosphorus Levels for Laying Hens in Second Production Cycle. *Braz. J. Poult. Sci.* **2009**, *11*, 39–49. Available online: <https://www.scielo.br/j/rbca/a/VgmDHBKHdXPv4vKMxb9qhk/?format=pdf&lang=en> (accessed on 19 July 2024).
128. Carvalho, L.S.S.; Fernandes, E.A. Formation and eggshell quality laying and breeding hens. *Med. Veterinária Recife* **2013**, *7*, 35–44.
129. Mello, J.F. Influência dos Níveis de Cálcio e Fósforo na Dieta de Matrizes de Codornas Japonesas, no Desempenho Produtivo e no Desenvolvimento Ósseo Embrionário da Progenie. Master's Dissertation, Graduate Program in Animal Science, State University of Maringá, Paraná, Brazil, 2015; 82p. Available online: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/1764/1/000220522.pdf> (accessed on 25 July 2024).
130. Chaves Hernández, A.J. Poultry and Avian Diseases. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 504–520. [CrossRef]
131. Zhao, S.C.; Teng, X.Q.; Xu, D.L.; Chi, X.; Ge, M.; Xu, S.W. Influences of low level of dietary calcium on bone characters in laying hens. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 7084–7091. [CrossRef]
132. Serna, J.; Bergwitz, C. Importance of Dietary Phosphorus for Bone Metabolism and Healthy Aging. *Nutrients* **2020**, *12*, 3001. [CrossRef]
133. Adedokun, S.A.; Adeola, O. Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits. *J. Appl. Poult. Res.* **2013**, *22*, 600–608. [CrossRef]
134. IFP—Inorganic Feed Phosphates. Phosphorus: A Vital Source of Animal Nutrition. 2024. Available online: <https://www.feedphosphates.org/index.php/guides/11-guides/11-phosphorus-a-vital-source-of-animal-nutrition> (accessed on 2 August 2024).
135. Sinclair-Black, M.; Garcia-Mejia, R.A.; Blair, L.R.; Angel, R.; Arbe, X.; Cavero, D.; Ellestad, L.E. Circadian regulation of calcium and phosphorus homeostasis during the oviposition cycle in laying hens. *Poult. Sci.* **2024**, *103*, 103209. [CrossRef] [PubMed]

136. Mazzuco, H. Osteoporose em Poedeiras Comerciais: Uma Doença Metabólica Multifatorial. Circular Técnica, n. 43, Concórdia: Embrapa Aves e Suínos. 2005, pp. 1–8. Available online: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/57891/1/CUsersPiazzonDocumentsCIT-43.pdf> (accessed on 4 August 2024).
137. Miranda, C.C. Formas Inorgânicas e Orgânicas de Minerais e Temperatura Ambiente Sobre o Desempenho, Imunidade e Parâmetros Sanguíneos em Frangos de Corte. Master's Dissertation, Graduate Program in Animal Science at São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, Botucatu, SP, Brazil, 2010; 59p. Available online: <https://www.fmvz.unesp.br/Home/ensino/pos-graduacao768/zootecnia/dissertacoes/teses/carolina-carvalho-de-miranda.pdf> (accessed on 2 August 2024).
138. Bertechini, A.G. Metabolismo dos Minerais. In *Nutrição de Monogástricos*; Bertechini, A.G., Ed.; UFLA: Lavras, Brazil, 2012; pp. 207–255.
139. Silva, A.P. Níveis de Cálcio e Fósforo na Dieta de Codornas Japonesas (*Coturnix japonica*) em Diferentes Fases do Ciclo de Produção e Seus Efeitos Sobre Desempenho Produtivo e Qualidade dos Ovos. Dissertação de Mestre, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Botucatu, SP, Brazil, 2011; 58p. Available online: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/d866ecc9-3f1e-4417-a647-48ead5a8c2f5/content> (accessed on 2 August 2024).
140. Albino, L.F.T.; Barreto, S.L.T. *Criação de Codornas para Produção de Ovos e Carne*; Aprenda Fácil: Viçosa, Brazil, 2003; 268p.
141. Pedroso, A.A.; Moraes, V.M.B.; Ariki, J.; Kronka, S.N. Níveis de cálcio e fósforo na ração sobre o desempenho e qualidade dos ovos de codornas japonesas. *Ars Vet.* **1999**, *15*, 135–139.
142. Masukawa, Y.; Fernandes, E.; Moraes, V.; Ariki, J.; Bruno, L. Níveis de cálcio da dieta sobre o desempenho e a qualidade da casca de ovos de codornas japonesas. *Ars Vet.* **2001**, *17*, 144–148.
143. Brandão, P.A.; Costa, F.G.P.; Silva, J.H.V.; Brandão, J.S.; Nobre, J.G.S.; Goulart, C.C. Exigência de cálcio para codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em postura. *Acta Scientiarum. Anim. Sci.* **2007**, *29*, 17–21. Available online: <https://www.redalyc.org/pdf/3031/303126486001.pdf> (accessed on 2 June 2024).
144. Costa, C.H.R.; Barreto, S.L.T.; Moura, W.C.O.; Reis, R.S.; Leite, C.D.S.; Maia, G.V.C. Níveis de fósforo e cálcio em dietas para codornas japonesas em postura. *Rev. Bras. De Zootec.* **2007**, *36*, 2037–2046. [CrossRef]
145. Costa, C.H.R.; Barreto, S.L.T.; Umigi, R.T.; Lima, H.J.D.A.; Araujo, M.S.; Medina, P. Balanço de cálcio e fósforo e estudo dos níveis desses minerais em dietas para codornas japonesas (45 a 57 semanas de idade). *Rev. Bras. De Zootec.* **2010**, *39*, 1748–1755. [CrossRef]
146. Costa, C.H.R.; Barreto, S.L.T.; Gomes, P.C.; Maia, G.V.C.; Lipari, C.A.; Hosoda, L.H. Teores de cálcio em dietas para codornas japonesas no terço final de postura (45 a 57 semanas de idade). *Arq. Bras. De Med. Veterinária E Zootec.* **2010**, *62*, 1225–1231. [CrossRef]
147. Amoah, J.K.; Martin, E.A.; Barroga, A.J.; Garillo, E.P.; Domingo, I. Calcium and phosphorus requirements of Japanese quail layers. *J. Appl. Biosci.* **2012**, *54*, 3892–3900. Available online: <https://m.elewa.org/JABS/2012/54/5.pdf> (accessed on 2 June 2024).
148. Vieira, D.V.G.; Barreto, S.L.T.; Valeriano, M.H.; Jesus, L.F.D.; Silva, L.F.F.; Mencalha, R.; Barbosa, K.S.; Mendes, R.K.V.; Cassuce, M.R.; Melo, T.S. Exigências de cálcio e de fósforo disponível para codornas japonesas de 26 a 38 semanas de idade. *Rev. Bras. De Saúde E Produção Anim.* **2012**, *13*, 204–213. Available online: <https://www.scielo.br/j/rbspa/a/NvXwgKTH5RX5gJQmx4DkHsp/?format=pdf&lang=pt> (accessed on 3 June 2024). [CrossRef]
149. Nascimento, M.Q. Níveis de Cálcio e de Fósforo em Dietas para Codornas Japonesas Utilizando Fosfato Bicálcico com Duas Granulometrias. Master's Dissertation, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, Brazil, 2013; 84p. Available online: <https://repositorio.ufes.br/server/api/core/bitstreams/52bfca24-9ea6-4806-87f3-a81e761c8309/content> (accessed on 2 June 2024).
150. Aguda, A.Y.; Sekoni, A.A.; Omeje, J.J. Requirement of calcium and available phosphorus for laying Japanese quail birds (*Coturnix japonica*) in Nigeria. *J. Anim. Poult. Sci.* **2015**, *4*, 31–38. Available online: https://www.researchgate.net/publication/313387866_Requirement_of_Calcium_and_available_Phosphorus_for_Laying_Japanese_quail_birds_Coturnix_coturnix_japonica_in_Nigeria (accessed on 19 June 2024).
151. Nascimento, M.Q.; Vargas Junior, J.G.; Pinto, C.E.L.; Demuner, L.F.; Petrucci, F.B.; Vieites, F.M. Optimal Available Phosphorus Levels in Diets Containing Different Dicalcium Phosphate Particle Sizes for Japanese Quails. *Braz. J. Poult. Sci.* **2019**, *21*, 001–008. [CrossRef]
152. Yang, J.H.; Hou, J.F.; Farquharson, C.; Zhou, Z.L.; Deng, Y.F.; Wang, L.; Yu, Y. Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens. *Br. Poult. Sci.* **2011**, *52*, 507–516. [CrossRef] [PubMed]
153. Yu, E.; Sharma, S. Physiology, Calcium. StatPearls. 2023. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482128/> (accessed on 4 April 2024).
154. Bianco, S.D.C.; Peng, J.-B.; Takanaga, H.; Suzuki, Y.; Crescenzi, A.; Kos, C.H.; Zhuang, L.; Freeman, M.R.; Gouveia, C.H.A.; Wu, J.; et al. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *J. Bone Miner. Res.* **2007**, *22*, 274–285. [CrossRef]
155. Hwang, C.-S.; Shemorry, A.; Varshavsky, A. Two proteolytic pathways regulate DNA repair by cotargeting the Mgt1 alkylguanine transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2142–2147. [CrossRef]
156. Sugiyama, T.; Kikuchi, H.; Hiyama, S.; Nishizawa, K.; Kusuhara, S. Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. *Br. Poult. Sci.* **2007**, *48*, 233–238. [CrossRef]

157. Chang, W.; Tu, C.; Chen, T.-H.; Bikle, D.; Shoback, D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci. Signal.* **2008**, *1*, 1–23. [CrossRef]
158. Schoulten, N.A.; Teixeira, A.S.; Freitas, R.T.F.; Bertechini, A.G.; Conte, A.J.; Silva, H.O. Níveis de Cálcio em Rações de Frangos de Corte na Fase Inicial Suplementadas com Fitase. *Rev. Bras. De Zootec.* **2003**, *32*, 1190–1197. [CrossRef]
159. Gobesso, A.A.O.; Wajnsztein, H.; Ribeiro, R.M.; Bastos, F.L.; Etchichury, M.; Araújo Júnior, A.M.C. Comparison between different sources of minerals in horses with nutritional secondary hyperparathyroidism. *Arq. Bras. De Med. Veterinária E Zootec.* **2021**, *73*, 73–81. [CrossRef]
160. Silva, B.C.; Bilezikian, J.P. Parathyroid hormone: Anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *22*, 41–50. [CrossRef]
161. Moe, S.M. Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. *Prim. Care: Clin. Off. Pract.* **2008**, *35*, 215–237. [CrossRef]
162. McDowell, L.R. Calcium and Phosphorus. In *Minerals in Animal and Human Nutrition*, 2nd ed.; Elsevier Science BV: Amsterdam, The Netherlands, 2003; 144p.
163. Pinheiro, S.R.F. Níveis De Fósforo, De Cálcio E De Cloreto De Sódio Para Aves De Linhagens De Crescimento Lento Criadas Em Sistema Semi-Confinado. Tese (Doutor em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista—UNESP, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2009. Available online: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/d5d73a2d-e13f-472a-8597-0e30913775cb/content> (accessed on 20 April 2024).
164. Underwood, E.J.; Suttle, N.F. *The Mineral Nutrition of Livestock*, 3rd ed.; CAB International: Wallingford, UK, 1999. Available online: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/book/10.1079/9780851991283.0000> (accessed on 19 April 2024).
165. Naot, D.; Musson, D.S.; Cornish, J. The Activity of Peptides of the Calcitonin Family in Bone. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 781–805. [CrossRef] [PubMed]
166. Cross, H.S.; Peterlik, M. Calcium and inorganic phosphate transport in embryonic chick intestine: Triiodothyronine enhances the genomic action of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J. Nutr.* **1988**, *118*, 1529–1534. [CrossRef]
167. Sugiyama, T.; Kusuha, S. Avian calcium metabolism and bone function. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2001**, *14*, 82–90. Available online: https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/7351228 (accessed on 20 July 2024).
168. Bronner, F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 387–393. [CrossRef] [PubMed]
169. Van Abel, M.; Hoenderop, J.G.J.; Bindels, R.J.M. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: Regulation and implications for disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2005**, *371*, 295–306. [CrossRef] [PubMed]
170. Hirnet, D.; Olausson, J.; Fecher-Trost, C.; Bödding, M.; Nastainczyk, W.; Wissenbach, U.; Flockerzi, V.; Freichel, M. The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* **2003**, *33*, 509–518. [CrossRef]
171. Belkacemi, L.; Bédard, I.; Simoneau, L.; Lafond, J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: A review. *Cell Calcium* **2005**, *37*, 1–8. [CrossRef]
172. Hoenderop, J.G.J.; Nilius, B.; Bindels, R.J.M. Calcium Absorption Across Epithelia. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 373–422. [CrossRef]
173. Kim, H.J.; Lee, G.S.; Ji, Y.K.; Choi, K.C.; Jeung, E.B. Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *291*, E234–E241. [CrossRef]
174. Suzuki, Y.; Kovacs, C.S.; Takanaga, H.; Peng, J.B.; Landowski, C.P.; Hediger, M.A. Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. *J. Bone Miner. Res.* **2008**, *23*, 1249–1256. [CrossRef]
175. Lee, G.S.; Jeung, E.B. Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, 132–139. [CrossRef]
176. Lambers, T.T.; Bindels, R.J.M.; Hoenderop, J.G.J. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 650–654. [CrossRef]
177. Burley, R.W.; Vadhera, D.V. *The Avian Egg. Chemistry and Biology*; John Wiley & Sons Co.: New York, NY, USA, 1989; 472p.
178. Yamamoto, K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* **1985**, *19*, 209–252. [CrossRef]
179. Ali, A.; Tan, H.Y.; Kaiko, G.E. Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction with the Microbiota in Food Allergy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 604054. [CrossRef]
180. Tang, V.W.; Goodenough, D.A. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1660–1673. [CrossRef]
181. Clemente-Suárez, V.J.; Martín-Rodríguez, A.; Redondo-Flórez, L.; Villanueva-Tobaldo, C.V.; Yáñez-Sepúlveda, R.; Tornero-Aguilera, J.F. Epithelial Transport in Disease: An Overview of Pathophysiology and Treatment. *Cells* **2023**, *12*, 2455. [CrossRef]
182. Friedman, P.A.; Gesek, F.A. Cellular calcium transport in renal epithelia: Measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol. Rev.* **1995**, *75*, 429–471. [CrossRef]
183. Peng, J.B.; Suzuki, Y.; Gyimesi, G.; Hediger, M.A. TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*; Kozak, J.A., Putney, J.W., Jr., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2018; Chapter 13. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531440/> (accessed on 20 August 2024).
184. Nijenhuis, T.; Hoenderop, J.G.J.; Van der Kemp, A.W.C.M.; Bindels, R.J.M. Localization and Regulation of the Epithelial Ca²⁺ Channel TRPV6 in the Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, *14*, 2731–2740. [CrossRef] [PubMed]
185. Brown, A.J.; Krits, I.; Armbrecht, H.J. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *437*, 51–58. [CrossRef]
186. Bar, A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: Mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2009**, *152*, 447–469. [CrossRef]

187. Bianco, S.D.; Peng, J.B.; Takanaga, H.; Kos, C.H.; Crescenzi, A.; Brown, E.M.; Hediger, M.A. Mice lacking the epithelial calcium channel CaT1 (TRPV6) show a deficiency in intestinal calcium absorption despite high plasma levels of 1,25-dihydroxy vitamin D. *FASEB J.* **2004**, *18*, A706. Available online: <https://eurekamag.com/research/035/305/035305455.php> (accessed on 20 August 2024).
188. Hurwitz, S.; Harrison, H.C.; Harrison, H.E. Effect of vitamin D3 on the in vitro transport of calcium by the chick intestine. *J. Nutr.* **1967**, *91*, 319–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Peng, J.B.; Chen, X.Z.; Berger, U.V.; Weremowicz, S.; Morton, C.C.; Vassilev, P.M.; Brown, E.M.; Hediger, M.A. Human calcium transport protein cat1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *278*, 326–332. [[CrossRef](#)]
190. Wilkens, M.R.; Kunert-Keil, C.; Brinkmeier, H.; Schröder, B. Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet. J.* **2009**, *182*, 294–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Wasserman, R.H.; Taylor, A.N. Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* **1966**, *152*, 794–796. [[CrossRef](#)]
192. Qin, X.; Klandorf, H.; Porter, D.W.; Holt, S.B.; Martin, W.G. Estrogen Enhancement of Ca-, Mg-, and Ca-Mg-Stimulated Adenosine Triphosphatase Activity in the Chick Shell Gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1993**, *89*, 4–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Qin, X.; Klandorf, H. Effect of Estrogen in Relation to Dietary Vitamin D3 and Calcium on Activity of Intestinal Alkaline Phosphatase and Ca-ATPase in Immature Chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1993**, *90*, 318–327. [[CrossRef](#)]
194. Morrissey, R.; Wasserman, R. Calcium absorption and calcium-binding protein in chicks on differing calcium and phosphorus intakes. *Am. J. Physiol. Leg. Content* **1971**, *220*, 1509–1515. [[CrossRef](#)]
195. Wu, J.C.Y.; Smith, M.W.; Mitchell, M.A.; Peacock, M.A.; Turvey, A.; Keable, S.J. Enterocyte expression of calbindin, calbindin mRNA and calcium transport increases in jejunal tissue during onset of egg production in the fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* **1993**, *106*, 263–269. [[CrossRef](#)]
196. Cai, Q.; Chandler, J.S.; Wasserman, R.H.; Kumar, R.; Penniston, J.T. Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1345–1349. [[CrossRef](#)]
197. McCormick, C.C. Passive diffusion does not play a major role in the absorption of dietary calcium in normal adults. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3428–3430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Fleet, J.C.; Schoch, R.D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2010**, *47*, 181–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Corradino, R.A.; Wasserman, R.H.; Pubols, M.H.; Chang, S.I. Vitamin D3 induction of a calcium-binding protein in the uterus of the laying hen. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *125*, 378–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Wasserman, R.H.; Smith, C.A.; Smith, C.M.; Brindak, M.E.; Fullmer, C.S.; Krook, L.; Penniston, J.T.; Kumar, R. Immunohistochemical localization of a calcium pump and calbindin-D28k in the oviduct of the laying hen. *Histochemistry* **1991**, *96*, 413–418. [[CrossRef](#)]
201. Bar, A.; Cohen, A.; Eisner, U.; Risenfeld, G.; Hurwitz, S. Differential Response of Calcium Transport Systems in Laying Hens to Exogenous and Endogenous Changes in Vitamin D Status. *J. Nutr.* **1978**, *108*, 1322–1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Nys, Y.; Parkes, C.O.; Thomasset, M. Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity, and intestinal calcium absorption in hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1986**, *64*, 293–299. [[CrossRef](#)]
203. Corradino, R.A.; Smith, C.A.; Krook, L.P.; Fullmer, C.S. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. *Endocrinology* **1993**, *132*, 193–198. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**ANEXO B – PHYTASE SUPER-DOSING MODULATES BONE PARAMETERS
AND THE CONCENTRATION OF THE CALCIUM EPITHELIAL CARRIER
CALBINDIN-D28K IN QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*) UNDER
THERMAL STRESS**

Phytase super-dosing modulates bone parameters and the concentration of the calcium epithelial carrier calbindin-D28k in quails (*Coturnix coturnix japonica*) under thermal stress

A. G. Ribeiro^{A,*} , R. S. Silva^A , F. S. Costa^B , E. G. Silva^A , J. E. Santos Ribeiro^C , E. P. Saraiva^A ,
F. G. P. Costa^A  and R. R. Guerra^A 

For full list of author affiliations and declarations see end of paper

*Correspondence to:

A. G. Ribeiro
Animal Science Department, Universidade
Federal da Paraíba, Areia, PB, Brazil
Email: apoloniogomes962@gmail.com

Handling Editor:

Natalie Morgan

Received: 19 February 2024

Accepted: 2 July 2024

Published: 12 August 2024

Cite this: Ribeiro AG *et al.* (2024) Phytase super-dosing modulates bone parameters and the concentration of the calcium epithelial carrier calbindin-D28k in quails (*Coturnix coturnix japonica*) under thermal stress. *Animal Production Science* **64**, AN24057. doi:10.1071/AN24057

© 2024 The Author(s) (or their employer(s)). Published by CSIRO Publishing.

ABSTRACT

Context. Thermal stress causes significant changes in the bioavailability of minerals, especially calcium, in laying birds, resulting in reduced egg production, and compromising egg quality. Therefore, it is necessary to use additives that provide better nutrient availability and minimise the negative effects caused by high temperatures. **Aims.** This study aimed to evaluate the effects of super-dosing the diet of laying quails submitted to different temperatures with phytase on their bone parameters and on the epithelial calcium transporter calbindin-D28K positivity. **Methods.** Seven hundred and twenty (720) Japanese quails in the production phase were distributed in a completely randomised design, in a 5×3 factorial design, with five supplementation levels of phytase (0, 500, 1000, 1500, and 3000 FTU/kg), and three temperatures (24°C, 30°C and 36°C), totalling 15 treatments, and six replications of eight birds each. The study began at the 8th week of age and continued for two cycles of 21 days, totalling 42 days of experiment. Bone parameters of the tibias and calbindin-D28K positivity were measured by immunohistochemistry. The data were submitted to variance, Tukey, and regression analyses. **Key results.** At 24°C, birds had higher averages for proximal, medial, and distal diaphyses than did birds at 30°C and 36°C, and a greater breaking strength of the tibias than did those at 36°C. There was an increasing linear effect on the medial diaphysis and Seedor index in the tibias with an increasing phytase supplementation level. Calcium (Ca) in the tibias was higher in birds kept at 30°C at a supplementation level of up to 1000 FTU of phytase, than in the birds at 24°C and 36°C, equalling at 1500 FTU, and lower at 3000 FTU. There was a quadratic effect for phosphorus (P) and the Ca:P ratio in the tibias of quails submitted to increasing concentrations of phytase. Quails kept at 30°C showed greater anti-calbindin-D28K positivity in the duodenum and jejunum, when compared to animals subjected to temperatures of 24°C and 36°C. Phytase doses of 500 and 1000 FTU increased calbindin-D28K positivity in the duodenum of quails kept at 30°C. At a supplementation level of 1500 FTU, phytase provided greater eggshell thickness and greater calbindin-D28K positivity in the uterus of quails kept at 36°C. **Conclusions.** Therefore, it is recommended to use 1500 FTU of phytase for Japanese quail exposed to high temperatures. **Implications.** These findings suggest that dietary phytase super-dosing can help alleviate thermal stress in Japanese quail.

Keywords: calcium transporter, exogenous enzyme, minerals, performance, production, supplementation, thermal stress, tibias.

Introduction

Quail farming for egg production has become a growing activity in Brazil, especially in the north-eastern region. This sector has experienced significant growth owing to the high performance of quails as layers, combined with low investment costs to start production (Moraes *et al.* 2021). In Brazil, where the most predominant climate is tropical, laying birds face significant challenges that affect their production (da Silva *et al.* 2022). Thermal stress caused by heat leads to a reduction in production, in addition to an increase in mortality, resulting in economic losses to the industry (Franzini *et al.* 2022). This situation is

particularly observed in laying quail farming, where eggshell formation is compromised because of impaired calcium utilisation, which is negatively influenced by increased temperatures (Moraes *et al.* 2021).

Circulating calcium (Ca) concentrations are maintained through intestinal absorption, and bone and renal reabsorption (Beggs and Alexander 2017). When necessary, Ca is rapidly mobilised from the blood to the uterus. To perform these functions, the epithelium relies on an important Ca transporter, calbindin-D28k. This protein plays a crucial role in regulating Ca metabolism in the body (Moraes *et al.* 2021).

Birds subjected to heat stress undergo physiological and behavioural changes, which severely affect feed intake and cause structural alterations in the intestinal epithelium, reducing digestibility and absorption of nutrients (Rostagno 2020). Allied to this are the effects of anti-nutritional factors such as phytate, which in addition to making phosphorus (P) unavailable, it also negatively influences the digestion and absorption of other minerals, amino acids, and energy (Bernardes *et al.* 2022; Dallmann *et al.* 2023).

Phytases are a class of exogenous enzymes the function of which is to degrade the phytate molecule (inositol hexaphosphate) present in diet ingredients, releasing starch, protein, amino acids, P, Ca, and other nutrients to be used by the animal (Hirvonen *et al.* 2019; Dang *et al.* 2022; Sampath *et al.* 2023). The use of phytase doses greater than the commercial recommended doses has aroused the interest of researchers, because super-dosing allows a more complete and rapid degradation of phytate, and the consequent release of nutrients (Farias *et al.* 2021).

Super-dosing phytase in poultry diets has shown consistent beneficial effects, especially in relation to bird performance (Pirgozliev *et al.* 2011; Pieniazek *et al.* 2017; Baghban-Kanani *et al.* 2020; Farias *et al.* 2021; Dang *et al.* 2022; Martínez-Vallespín *et al.* 2022; Sampath *et al.* 2023), improvements in bone characteristics (Manobhavan *et al.* 2016; Sharma *et al.* 2016), in amino acid digestibility (Dersjant-Li *et al.* 2022), and the quality of the eggs, especially the shells (Rojas *et al.* 2017; Farias *et al.* 2021). It is worth mentioning that these studies were conducted with laying hens and broiler chickens, thus opening up expectations of similar effects in quails. The objective of this study was therefore to evaluate the effects of a super-dose of phytase on bone parameters and on the epithelial Ca transporter calbindin-D28K positivity in laying quails submitted to thermoneutral conditions and heat stress.

Materials and methods

Experimental site and ethics committee

The experiment was conducted in the climatic chambers belonging to the Department of Animal Science at the Federal University of Paraíba. The project had ethical approval from the Animal Care and Use Committee (CEUA) of the Federal

University of Paraíba, Brazil, under the protocol process number (3695120121). Euthanasia was performed by electronarcosis in accordance with the institution's CEUA guidelines.

Animals and experimental design

A total of 720 Japanese quails in the production phase from the eighth week of life were used. They were distributed in a completely randomised design, in a 5×3 factorial scheme, with five phytase concentrations (0, 500, 1000, 1500 and 3000 FTU) and three temperatures (24°C, 30°C and 36°C), with six replications with eight birds each (48 animals per treatment and 240 animals per climatic chambers), representing thermoneutral (24°C) and thermal stress (30°C and 36°C) temperatures, totalling 15 treatments. The quails began treatments at 8 weeks of age and remained for two cycles of 21 days, totalling 42 days of experiment.

Housing

The birds were housed in three climatic chambers with dimensions of 19.71 m². Each chamber was equipped with 30 metal cages (55 × 35 × 27 cm) with 01 nipple drinker and a trough-type feeder per cage. The chambers had a system of air conditioning, heating, humidifying, and dehumidifying, with an exhaust fan, thermostat, and lighting system. The size of the birdcage used was 481.25 cm²/bird. The lighting program was 17 h of artificial light per day throughout the experimental period.

Diets and experimental treatment

The diets (Table 1) were formulated according to the recommendations of the Brazilian Tables for Poultry and Swine (Rostagno *et al.* 2017), varying only with phytase supplementation. All diets were formulated with reduced Ca and P concentrations, according to provisions of the enzyme matrix for dietary phytase at 500 FTU (0.165% Ca, 0.150% P).

Phytase added to the experimental diets was from *Escherichia coli* produced in *Thricoderma reesei* (Quantum Blue, AB Vista, Marlborough, UK), replacing part of the inert ingredient in the diets.

The treatments consisted of five diets composed of corn and soybean meal, which were supplied in each climatic chamber (24°C, 30°C and 36°C). Treatment 1 (0 FTU, T1) consisted of a negative control diet, without phytase supplementation and with reduced Ca and P concentrations. Treatment 2 (500 FTU, T2) was a balanced diet with the addition of phytase, which followed the recommendations for the use of the phytase nutritional matrix for Ca and P. The other treatments (1000 FTU (T3); 1500 FTU (T4); 3000 FTU (T5)) contained a super-dose of phytase. The concentrations of phytase were achieved by adding phytase to replace inert material, considering the concentrations in the negative

Table 1. Experimental diets (Treatments T1–T5), containing five supplementation levels of phytase (0, 500, 1000, 1500 and 3000 FTU) and reduction in phosphorus and calcium concentrations, taking into account the 500 FTU matrix of the enzyme, for Japanese quails in the laying phase.

Item	Unit	T1 0 FTU	T2 500 FTU	T3 1000 FTU	T4 1500 FTU	T5 3000 FTU
Ingredients						
Corn, 7.88%	g/kg	597	597	597	597	597
Soybean meal, 45.22%	g/kg	305	305	305	305	305
Soybean oils	g/kg	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
DL-methionine	g/kg	3.98	3.98	3.98	3.98	3.98
L-lysine HCl	g/kg	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65
L-threonine	g/kg	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Limestone	g/kg	74.4	74.4	74.4	74.4	74.4
Dicalcium phosphate, 18.5%	g/kg	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Common salt	g/kg	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
Mineral premix ^A	g/kg	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin premix ^B	g/kg	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Choline	g/kg	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Antioxidant	g/kg	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Inert ^C	g/kg	0.60	0.50	0.40	0.30	0.00
Phytase ^D	g/kg	0.00	0.10	0.20	0.30	0.60
Total		1000	1000	1000	1000	1000
Nutrients						
Phytase	FTU/kg	0	500	1000	1500	3000
Metabolisable energy	kcal/kg	2800	2800	2800	2800	2800
Crude protein	g/kg	190	190	190	190	190
Calcium	g/kg	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9
Phosphorus total	g/kg	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94
Available phosphorus	g/kg	1.77	1.77	1.77	1.77	1.77
Potassium	g/kg	7.32	7.32	7.32	7.32	7.32
Sodium	g/kg	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Chlorine	g/kg	3.19	3.19	3.19	3.19	3.19
Mogin number	mEq/kg	164.6	164.6	164.6	164.6	164.6
Digestible amino acid (%)						
Digestible methionine	g/kg	6.47	6.47	6.47	6.47	6.47
Digestible methi. + cystine	g/kg	9.08	9.08	9.08	9.08	9.08
Digestible lysine	g/kg	11.07	11.07	11.07	11.07	11.07
Digestible threonine	g/kg	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75
Digestible tryptophan	g/kg	2.07	2.07	2.07	2.07	2.07
Digestible valine	g/kg	7.98	7.98	7.98	7.98	7.98

T1, Treatment 1 (0 FTU); T2, Treatment 2 (500 FTU); T3, Treatment 3 (1000 FTU); T4, Treatment 4 (1500 FTU); T5, Treatment 5 (3000 FTU). The treatments exposed above were subjected to three different temperatures (24°C, 30°C and 36°C).

^AMineral premix (concentration/kg of product): manganese, 60 g; iron, 80 g; zinc, 50 g; copper, 10 g; cobalt, 2 g; iodine, 1 g; and selenium, 250 mg.

^BVitamin premix (concentration/kg of product): vitamin A, 15,000 IU; vitamin D3, 1,500,000 IU; vitamin E, 15,000 IU; vitamin B1, 2.0 g; vitamin B2, 4.0 g; vitamin B6, 3.0 g; vitamin B12, 0.015 g; nicotinic acid, 25 g; pantothenic acid, 10 g; vitamin K3, 3.0 g; folic acid, 1.0 g.

^CInert, kaolin.

^DPhytase enzyme, 100 g/t provides 500 FTUs/kg of feed.

control diet. The birds had access to water and feed *ad libitum* throughout the experimental period.

Organ harvesting

At the end of the second production cycle, eight birds per treatment were randomly chosen and euthanised by electronarcosis, to collect the organs small intestine (duodenum, jejunum) and uterus, for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry for anti-calbindin-D28k

Histological slides containing duodenum, jejunum, and uterus from eight animals per treatment were randomly chosen. The antibody (D-4) used was calbindin-D28k (mouse monoclonal immunoglobulin G (Sc 365360, Santa Cruz Biotechnology). The slides were deparaffinised and rehydrated and were subsequently subjected to the Em Vision™ FLEX+, Mouse, High pH, kit protocol (Link) (Reference K8002), Agilent Technologies. The slides were washed in Wash Buffer for 2 min. Antigen retrieval was undertaken by heating the EnVision FLEX Target Retrieval Solution in double boiler/steamer equipment, at a temperature of 99°C for a period of 30 min, and then waiting for the temperature to drop for another 20 min to room temperature. Then the tissues were washed in Wash Buffer for 20 min. At the end of the antigen recovery process, the slides were sent to the EnVision FLEX+ staining process, where the tissues were outlined with a histological pen to confine the flow of reagents in the tissue area.

Subsequently, the slides were subjected to EnVision FLEX Peroxidase Block solution for 5 min, and then washed in Wash Buffer for 5 min. The slides were kept for 20 min in primary antibody, diluted in Wash Buffer (1:500). The tissues that received the anti-calbindin-D28k antibody were incubated as a positive control and those that received only the Wash Buffer as a negative control. After a 5 min bath in Wash Buffer, the slides were subjected to the EnVision FLEX + MOUSE reagent for 15 min, to increase signal amplification by four to five times. After washing in Wash Buffer for 5 min, the slides were incubated with EnVision FLEX/HRP for 20 min at room temperature, and then washed in Wash Buffer for 5 min. Then they were put into EnVision FLEX Substrate Working Solution for 5 min, then again washed in Wash Buffer for 5 min. Counterstaining was performed with Harris haematoxylin. Photomicrographs were taken by using Zeiss KS-400 programs under an Olympus BX60 microscope and AxioCam camera. The more antibody-positive the sample was, the greater was the calbindin-D28k protein production. Therefore, positivity can be seen in the tissue by staining the DAB chromogen brown; i.e. the brown colour demonstrates the location of the calbindin-D28k protein in the tissue (cytoplasmic protein).

Bone-strength analysis and Seedor index

After cycle, the tibias of eight birds per treatment were collected for analysis of bone composition and resistance.

For the analysis of bone mineral composition, the right tibias were used. For resistance analysis, the left tibias of these same birds were used. Subsequently, tibias were thawed and adherent soft tissues were cleaned away, without causing damage to the bone structure. The cleaned bones were dried in a forced-ventilation oven at 55°C for 48 h. After drying, length measurements were recorded with the aid of a digital caliper. The tibias were weighed, to calculate the Seedor index, so as to provide an estimate of bone density (amount of minerals per unit area or volume), using the bone weight (mg) and length (mm) ratio, according to *Seedor et al. (1991)*.

$$\text{Seedor index} = \text{bone weight (mg)} / \text{length (mm)}.$$

Resistance analysis was performed with *in natura* tibias, by using a universal texturometer (Model TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, United Kingdom), with a 50 kg load cell at a speed of 30 mm/min. A computer program registered the force (kgf) necessary to completely break the bone.

Computerised densitometry

Computed tomography was performed on eight tibias per treatment by using a Hi-speed FX1 CT scanner (General Electric, Fairfield, CT 06824, USA) from FOCUS laboratory. The bones were placed side by side on the examining table to obtain images. Cross-sectional images were obtained through 2 mm thick sectional sections at a reconstruction interval of 1 mm, 120 KV, and automatic tube current (mA) at a speed of one rotation per second. The images generated by computed tomography consisted of cross-sectional sections that allowed the precise location of the region of interest to identify changes in bone-tissue density. Bone-density values obtained through quantitative tomographic evaluation correspond to the average attenuation of the pixels contained in the selected region of interest, given in Hounsfield units (*Chalmers et al. 2006; Adams 2009*).

Subsequently, the images were analysed with the Dicom software (ver. 1.1.7, Horos, Purview, Annapolis, MD 21401, USA; <https://horosproject.org/>) to estimate individual bone radiodensity values at three different section regions of the diaphysis (proximal, medial, and distal). Each region was divided into four quadrants and a circular region of interest was selected for densitometric evaluation of the cortical bone (*Fig. 1*). The results were presented in a Hounsfield units (HU), subsequently corrected, and then converted into mg/cm³ of Ca hydroxyapatite by using the equation $\text{BMD} = 200 \text{ HU} / (\text{HU}_w - \text{HU}_b)$, according to the methodology described by *Oliveira et al. (2012)* and *Simões de Souza et al. (2018)*.

Minerals in the tibia

For the analysis, the tibias previously subjected to bone resistance were used. The eight tibias from each treatment were used to create a composite sample resulting in four

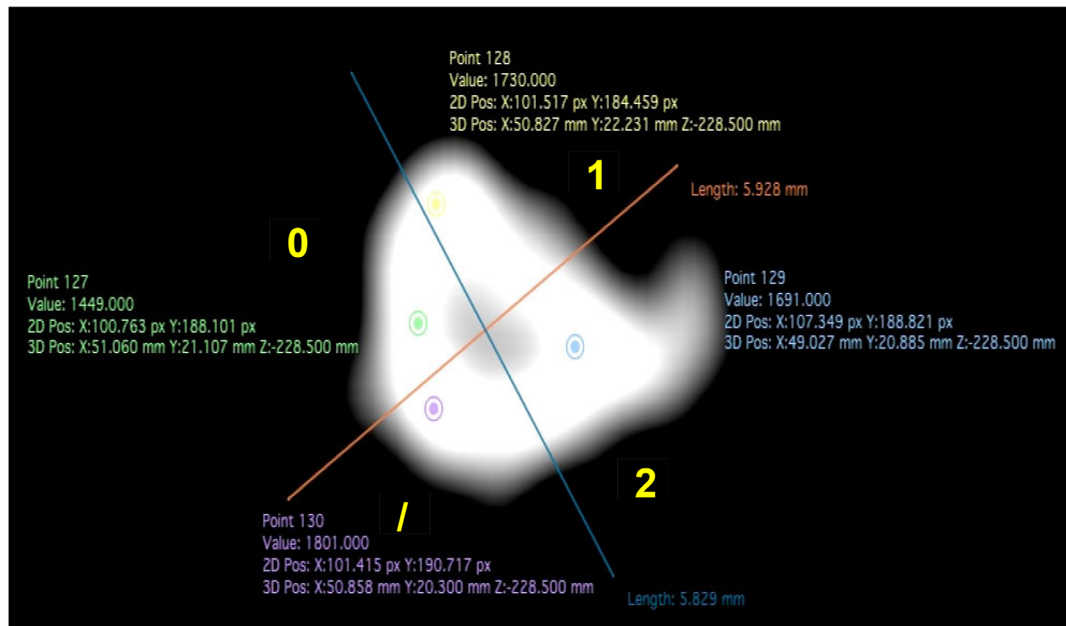


Fig. 1. Cross-sectional tomographic image of the tibia of Japanese quail.

replications per treatment. After thawing, the bones were placed in an oven at 105°C for 24 h and then calcined in a muffle furnace (Model 2000F, Zezimaq, Minas Gerais, BR) for 4 h at 600°C (Yan *et al.* 2005). After determining the ash content, approximately 0.5 g of the sample was digested in 10 mL of hydrochloric acid (37% PA) at a concentration of 1:1, in an open system, for 30 min. Then, the samples were filtered through quantitative filter paper and subsequently diluted in deionised water until a final volume of 50 mL of mineral solution was produced, as recommended by Silva and Queiroz (2006).

The P concentration was analysed by spectrometry on a UV-VIS spectrophotometer model UV-5100 (Metash Instruments, Shanghai, China), according to the methodology proposed by Rangana (1979). The Ca concentration was analysed by using an atomic absorption spectrometer, with a flame atomiser, Model iCE 3500 (Thermo Scientific, Cambridge, UK). Hollow cathode lamps (Photron, Victoria, Australia), containing the (Ca) mineral to be analysed were used as the primary radiation source, and background correction was performed with a deuterium lamp attached to the equipment.

Standard curves were prepared with specific standards for each chemical element (Specsol, São Paulo, Brazil). Instrumental parameters were used according to the manufacturer's recommendations, and data were processed using SOLAAR software (Thermo Scientific). For all analyses, the air-acetylene flame was used to atomise the sample. For Ca analysis, samples with lanthanum (La) were added until reaching a final concentration of 0.1% La. The Ca:P (Ca:P) ratio was obtained by dividing the percentage of Ca by that of P in the ash.

Feed intake, total egg production and eggshell thickness

The parameters of feed intake (FI, g/bird.day), total egg production (TEP, %) and eggshell thickness (ET, mm) were evaluated. The performance evaluation period was divided into two 21-day cycles. At the end of each period, the leftover feed from each plot was collected to calculate the FI. FI was determined by dividing the difference between the feed provided during the treatment phase and the weighed feed leftover at the end of the phase by the number of birds in the cage. The averages were totalled to result in the average FI per bird in the cage (g/bird.day).

Egg production was calculated by collecting the number of eggs produced daily, always correcting for mortality, so that the number of intact eggs produced was expressed as a percentage for each treatment, over the average number of birds per period (%/bird.day), which corresponded to the production of marketable eggs.

At the end of each production cycle, four eggs were selected per experimental plot or cage. The shells were broken in the middle (equatorial region), washed and then dried in an oven at 55°C for 24 h. The ET was subsequently analysed and determined with the aid of a digital micrometer (Mitutoyo, resolution 0.001 mm) at the midline of the egg.

Statistical analyses

The data were subjected to an ANOVA, by using the statistical software R ver. 4.2.0 (R Core Team 2022) to determine the effects of different phytase concentrations and temperature ranges on the measured variables. For variables showing

significant ($P < 0.05$) differences, Tukey's test was conducted to compare the means across different temperatures. In addition, regression analysis was employed to identify the optimal phytase concentration.

The variables were analysed according to the following mathematical equation:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} = response variable, μ = overall mean, α_i = effect of the i th concentration of phytase, β_j = effect of the j th temperature range, $(\alpha\beta)_{ij}$ = interaction effect between the i th concentration of phytase and the j th temperature range and ε_{ijkl} = random error term associated with each observation, assumed to be normally distributed with a mean of zero and constant variance.

In the case of significance for phytase, the following equation was applied:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$$

where Y_i = the response variable for the i th observation, β_0 = the intercept, representing the expected value of Y when phytase is at zero (baseline concentration), X_i = phytase concentration for the i th observation, β_1 = the slope, indicating the effect of a one-unit increase in phytase on the response variable and ε_i = random error term for the i th observation, assumed normally distributed with a mean of zero and constant variance.

Results

During the experimental period, the birds appeared clinically normal and no mortality was recorded.

Bone parameters of the tibias

From the radiodensity analysis in the different regions of the tibias (Table 2), it was observed that phytase concentration had no significant influence on the values of the proximal and distal diaphyses, or on the interaction between temperature and phytase ($P > 0.05$). However, there was a notable effect in relation to the different temperatures evaluated. Specifically, the birds kept at 24°C showed a significantly ($P < 0.001$) higher mean density in the proximal, medial, and distal diaphyses than did the groups kept at temperatures of 30°C and 36°C.

Regarding the medial diaphysis, we noticed an increasing linear effect ($P = 0.034$) in relation to phytase concentrations. With an increasing concentration of phytase added to the diet, the density for this variable increased. No effects were observed under the temperature versus phytase interaction ($P > 0.05$).

The results obtained for the Seedor index (Table 3) demonstrated a linear effect ($P = 0.0012$), increasing as the phytase concentrations increased. No effect was observed for temperatures, nor for the interaction between temperature and phytase ($P > 0.05$).

The averages obtained for tibia resistance (Table 3) demonstrated a significant ($P = 0.0147$) effect only at 24°C, with an increase in the breaking force of the tibias when compared with birds at 36°C. No effect was observed for

Table 2. Mean values of radiodensity in different regions of the tibia of Japanese quails fed with different doses of phytase (0, 500, 1000, 1500 or 3000 FTU/kg) and subjected to different temperatures.

Parameter	Temperature (°C)	Bone density (mg/cm ³)					Mean	CV%	P-value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Phytase	Temp × phytase	Regression
Proximal diaphysis	24	1059	814	1058	997	975	981a	16.30	<0.001	0.055	0.949	n.s.
Proximal diaphysis	30	754	760	829	908	800	810b					
Proximal diaphysis	36	861	821	793	856	949	856b					
Mean		891	798	893	921	908						
Medial diaphysis	24	965	870	1110	1030	1012	997a	19.10	<0.001	0.050	0.719	0.034 ^A
Medial diaphysis	30	719	716	877	861	821	799b					
Medial diaphysis	36	901	784	847	861	944	867b					
Mean		862	790	944	917	926						
Distal diaphysis	24	952	896	1034	958	960	960a	19.30	<0.001	0.643	0.538	n.s.
Distal diaphysis	30	715	715	758	862	724	754b					
Distal diaphysis	36	878	771	760	791	855	811b					
Mean		848	794	851	870	846						

Means within a column within each bone region followed by different lower-case letters are significantly different in bone density at different temperatures, by Tukey's test (at $P = 0.05$).

CV%, coefficient of variation; n.s., not significant.

^ALinear effect ($y = 0.0313x + 850.28$; $R^2 = 0.3299$). Treatment 1, 0 FTU; Treatment 2, 500 FTU; Treatment 3, 1000 FTU; Treatment 4, 1500 FTU; Treatment 5, 3000 FTU.

Table 3. Bone parameters of the tibias of Japanese quails fed with different doses of phytase and subjected to different temperatures.

Parameter	Temperature	Phytase (FTU/kg)					Mean	CV%	P-value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Phytase	Temp × phytase	Regression
Seedor index (mg/mm)	24	12.27	12.12	13.05	12.32	12.65	12.48	9.20	0.495	0.004	0.328	0.012 ^A
	30	11.60	12.12	13.30	14.04	12.90	12.79					
	36	12.31	12.30	12.97	13.03	13.23	12.77					
	Mean	12.06	12.18	13.11	13.13	12.93						
Bone resistance (kgf)	24	5.36	4.79	5.80	5.24	4.67	5.17a	22.50	0.015	0.350	0.927	n.s.
	30	5.12	4.52	5.18	4.95	4.62	4.88ab					
	36	4.26	4.62	4.54	4.31	4.30	4.41b					
	Mean	4.91	4.64	5.17	4.83	4.53						
Calcium (g/100 g)	24	13.79b	11.87b	13.52b	15.05a	15.89a	14.02	7.20	<0.001	0.365	<0.001	n.s.
	30	16.24a	16.99a	16.65a	15.05a	13.52b	15.69					
	36	15.34ab	13.75b	14.13b	14.09a	13.59b	14.18					
	Mean	15.12	14.20	14.77	14.73	14.33						
Phosphorus (g/100 g)	24	5.55	4.59	6.55	6.70	6.46	5.97b	17.60	0.007	0.040	0.075	0.019 ^B
	30	5.55	7.75	9.11	7.68	6.14	7.25a					
	36	6.38	5.77	6.38	6.19	6.12	6.17b					
	Mean	5.83	6.04	7.35	6.85	6.24						
Ca:P ratio	24	2.59	2.59	2.09	2.26	2.59	2.42	13.70	0.433	0.005	0.291	0.003 ^C
	30	2.94	2.30	1.87	2.03	2.22	2.27					
	36	2.40	2.42	2.29	2.29	2.31	2.34					
	Mean	2.64	2.44	2.08	2.19	2.37						

Means within a column within each parameter followed by different lower-case letters are significantly different at different temperatures, by Tukey's test (at $P = 0.05$). CV%, coefficient of variation; n.s., not significant; kgf, kilogram force.

^ALinear effect ($y = 0.0003x + 12.322$; $R^2 = 0.426$).

^BQuadratic effect ($y = -5E-07x^2 + 0.0016x + 5.7276$; $R^2 = 0.721$), maximum point 1600.

^CQuadratic effect ($y = 2E-07x^2 - 0.0006x + 2.6478$; $R^2 = 0.873$), minimum point 1500. Treatment 1, 0 FTU; Treatment 2, 500 FTU; Treatment 3, 1000 FTU; Treatment 4, 1500 FTU; Treatment 5, 3000 FTU.

phytase concentration, or for the interaction between temperature and phytase ($P > 0.05$).

In the analysis of the Ca concentration in the tibias (Table 3), we noticed a significant ($P < 0.001$) impact of the interaction between temperature and phytase concentration. Higher Ca concentrations were observed in birds kept at 30°C, than in those at 24°C and 36°C, and at increasing phytase concentrations, of up to 1000 FTU. However, at 1500 FTU, Ca concentrations became equal among the different temperatures. At 3000 FTU, Ca concentrations at 30°C and 36°C were lower than those at 24°C.

In the tibia (Table 3), there was a significant ($P = 0.018$) quadratic effect of phytase concentration on P concentration. As phytase concentration increased in the diet, P concentrations also increased in the tibia, reaching a peak at a 1600 FTU of phytase (Table 4). An effect was also observed among temperatures ($P = 0.007$). Birds subjected to temperatures of 30°C demonstrated higher concentrations of P in the tibias than did the birds subjected to temperatures of 24°C and 36°C. There was no interaction of temperature and phytase concentration ($P = 0.075$).

Table 4. Regression equations of bone parameters of tibias in Japanese quails fed with different doses of phytase and subjected to different temperatures.

Parameter	Effect	Equation	R ²	Concentration (FTU)
Medial diaphysis	Linear	$y = 0.0313x + 850.28$	0.330	—
Seedor index	Linear	$y = 0.0003x + 12.322$	0.426	—
Phosphorus	Quadratic	$y = -5E-07x^2 + 0.0016x + 5.7276$	0.721	1600 ^{Max}
Ca:P ratio	Quadratic	$y = 2E-07x^2 - 0.0006x + 2.6478$	0.873	1500 ^{Min}

In the Ca:P ratio of the tibias (Table 3), there was a quadratic effect ($P = 0.0032$). As phytase concentrations increased, the Ca:P ratio reduced, reaching a minimum point of the ratio at 1500 FTU of dietary phytase (Table 4). No effect of temperature ($P = 0.4332$) or temperature–phytase interaction on the Ca:P ratio ($P = 0.2909$) was observed.

Immunohistochemistry

The three organs studied (duodenum, jejunum, and uterus) in the quail were positive for the epithelial Ca transporter, calbindinD28K (Table 5). In the intestinal segments (duodenum and jejunum), positivity occurred in enterocytes. Greater anti-calbindinD28K positivity was observed in the duodenum than in the jejunum (Fig. 2a, b).

In the uterus, positivity occurred in the uterine glands below the epithelium in the uterine folds, yet the epithelium is not positive for this transporter (Fig. 2c).

In this current study, we observed a lower calbindin-D28K positivity in the duodenal epithelium in quails kept at the thermal comfort temperature (24°C). Lower FI ($P < 0.001$), and calbindin-D28K positivity, were also observed in the jejunum (Fig. 3) of quails kept at a 36°C (Supplementary Material Table S1).

In contrast, the highest TEP (Supplementary Material Table S1), and greater anti-calbindin D28k positivity occurred in the intestinal epithelial cells of the duodenum and jejunum in quails kept at 30°C ($P < 0.001$).

It was also seen that the use of phytase in doses of 500 and 1000 FTU for birds subjected to 30°C increased

calbindin-D28K positivity in the duodenum. Another important result was that phytase at a dietary concentration of 1500 FTU increased ET (Supplementary Material Table S1) at the highest temperature (36°C), when compared with the treatment without phytase at the same temperature ($P < 0.001$). This result agreed with the greater positivity to anti-calbindinD28K in the uterus of the quails in the treatments with phytase (Fig. 4).

Greater anti-calbindinD28K positivity was also observed in the duodenum of quails supplemented with 3000 FTU at 36°C, than at 24°C and 30°C. These results were also associated with the maintenance of ET of the quails under thermal stress (36°C), when compared with the eggshells of the quails at thermoneutral temperatures (24°C). Greater anti-calbindinD28K positivity was also observed in the uterus of quails supplemented with phytase (3000 FTU), than in that of the birds not receiving the enzyme.

Discussion

Thermal heat stress (ETC) has attracted the attention of poultry producers because of its harmful impacts, especially on laying birds in tropical climate regions. Heat stress triggers a series of physiological changes, such as oxidative stress, disturbances in acid–base balance and weakening of the immune system. These changes culminate in an increase in the mortality rate and a decrease in feed efficiency, as well as a reduction in bodyweight, feed consumption, egg production (Wasti *et al.* 2020), and bone development (Zhang *et al.* 2021). Research is attempting to find strategies to mitigate the effects of heat stress.

Bone parameters of the tibias

In our research, exposing birds to high temperatures was shown to be harmful to the integrity of the tibia and its bone density. Quails kept under severe heat stress (36°C) had the worst bone densitometry and tibial resistance indices mainly when compared with birds kept at a comfort temperature (24°C). An obvious cause of this reduction in bone quality and mass is associated with deficient Ca intake, because ETC reduces FI and the absorption of nutrients and vitamins, which are important to bone formation (Zhang *et al.* 2021).

Previous studies support the negative role of ETC in regulating bone health in birds. For example, Koelkebeck *et al.* (1993) observed that in laying hens subjected to high environmental temperatures, there was a reduction in the bone mass of the tibia. Sahin *et al.* (2009) showed that quails subjected to ETC exhibited a significant decrease in tibial bone mineral density and tibial ash compared with those in a thermoneutral environment. Similar results were described by Jankowski *et al.* (2015), when evaluating the effects of population density and heat stress in turkeys. When working with broiler chickens (Ross 308) from 1 to 39 days of age, Zhang *et al.* (2021) observed a lower tibia resistance in birds when subjected to ETC. These findings

Table 5. Positivity to the calbindin-D28K antibody, a Ca transporter, in the duodenum, jejunum, and uterus of Japanese quails subjected to different temperatures.

Temperature	0 FTU	500 FTU	1000 FTU	1500 FTU	3000 FTU
Duodenum					
24°C	++	++	++	++	++
30°C	++	+++	+++	++	++
36°C	++	++	++	++	+++
Jejunum					
24°C	++	++	+++	++	+
30°C	++	+++	++	++	++
36°C	+	++	++	++	+
Uterus					
24°C	++	+++	++	++	+++
30°C	++	++	+++	++	+++
36°C	++	+++	++	+++	+++

0, 500, 1000, 1500, and 3000 FTU refer to the phytase supplementation in the Japanese quail diet. Antibody positivity was assessed from crosses (+, low positivity; ++, moderate positivity; and +++, extensive positivity). Treatment 1, 0 FTU; Treatment 2, 500 FTU; Treatment 3, 1000 FTU; Treatment 4, 1500 FTU; Treatment 5, 3000 FTU.

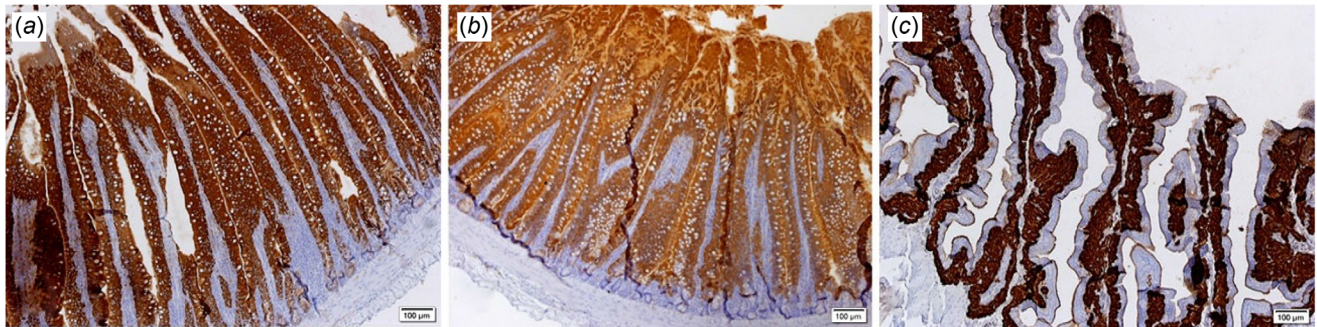


Fig. 2. Photomicrographs of organs from Japanese quails with positivity for the antibody, calcium epithelial transporter, calbindin-D28K. (a) Small intestine, duodenum portion. Note positivity in the epithelium but not in the lamina propria of the mucosa. (b) Small intestine, jejunum portion. Note positivity in the epithelium but not in the lamina propria of the mucosa. (c) Uterus. Note positivity in uterine glands but not in the epithelium. Immunohistochemistry for anti-calbindinD28K, counterstained with haematoxylin.

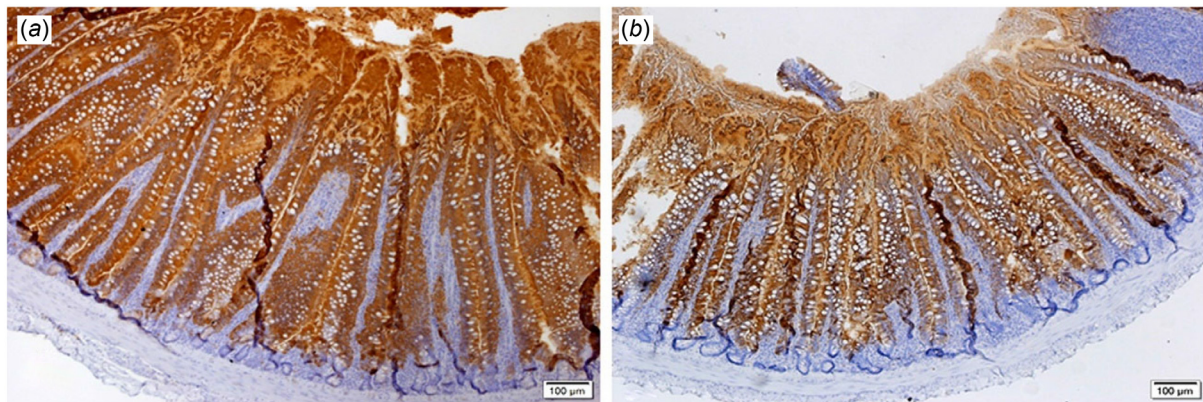


Fig. 3. Photomicrographs of the jejunum of Japanese quails with positivity to the antibody, calcium epithelial transporter, calbindinD28K. (a) Representative jejunum of quails in an environment of 24°C or 30°C. (b) Jejunum of quails in an environment of 36°C, showing lower positivity to anti-calbindinD28K. Immunohistochemistry for anti-calbindinD28K, counterstained with haematoxylin.

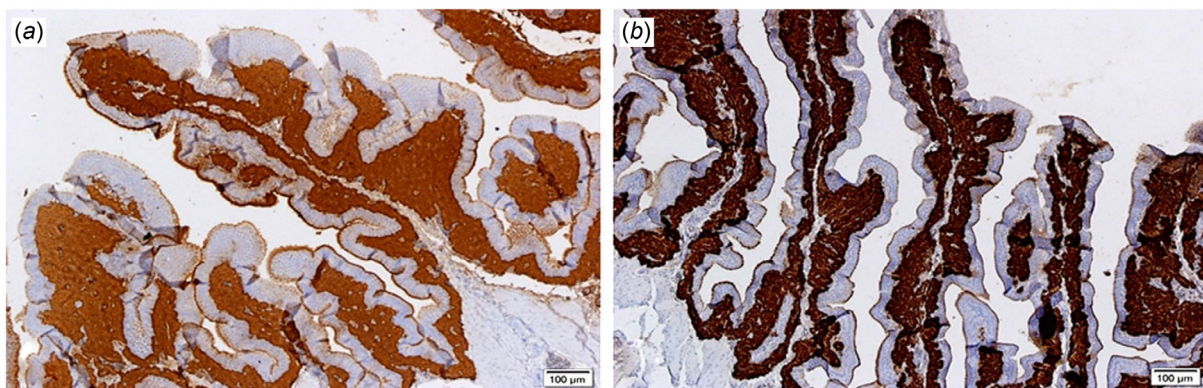


Fig. 4. Photomicrographs of uteri from Japanese quails with positivity to the antibody, calcium epithelial transporter, calbindin-D28K. (a) Uterus of quails without phytase supplementation in their diet. (b) Uterus of quails subjected to phytase supplementation in their diet, showing higher positivity to anti-calbindin-D28K. Immunohistochemistry for anti-calbindinD28K, counterstained with haematoxylin.

support the results of our study that elevated temperatures are detrimental to the integrity and bone density of the tibias.

Several nutritional strategies have been used to mitigate the negative effects of ETC on bone health in birds (Hosseini-Vashan *et al.* 2016; Yan *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2021). Phytase stands out as a proposal to mitigate the effects of heat stress, because it not only allows the degradation of dietary phytate, releasing P and Ca (Hirvonen *et al.* 2019), but in the process, minerals and vitamins such as zinc and vitamin D are also released. Both are linked to bone development (Zhang *et al.* 2020, 2021) and act as antioxidant factors, removing free radicals and protecting cell membranes from oxidative stress caused by high temperature.

The use of phytase doses greater than the commercial recommendations (Dersjant-Li *et al.* 2014) has aroused the interest of researchers, because super-dosing allows for a more complete and rapid degradation of phytate in dietary ingredients, along with an increased availability of nutrients (Cowieson *et al.* 2011; Farias *et al.* 2021).

The use of increasing concentrations of phytase in our study had a positive linear impact on tibial medial shaft density and the Seedor index, demonstrating a significant increase in bone density. This effect has been shown to be directly related to the increase in the availability and retention of essential minerals, such as Ca and P, caused by the action of phytase in the breakdown of phytate (Gautier *et al.* 2018; Broch *et al.* 2021).

Dersjant-Li *et al.* (2018) demonstrated that by increasing the dietary phytase concentration from 500 to 1000 FTU/kg, there was a notable increase in the ileal digestibility of P and Ca, along with an increase in the mineral content of the bones. When evaluating the effects of two supplementation levels of phytase in the diet of broiler chickens, Sens *et al.* (2021) also observed that supplementation with a higher dose of phytase (2500 FTU) resulted in higher ash content and Seedor index in tibia bones. These results agree with our observations of a higher density in the mid-diaphysis region and a higher Seedor index in the tibias as dietary phytase concentration increases.

Quails are notably more tolerant to thermal stress than are broilers or laying hens. This is due to the greater surface area: body volume ratio, providing quails with a greater capacity to dissipate endogenous heat (Porto *et al.* 2021). For laying quails, the thermal-comfort temperature range is between 21°C and 27°C (Alagawany *et al.* 2017).

When quails face conditions of thermal stress as a result of heat, there is a possible change in the acid–base balance of the blood, as well as in the regulation of electrolytes such as potassium, sodium, and Ca. They usually resort to rapid and shallow breathing (panting) to promote heat loss through evaporation, thus trying to maintain body temperature (Vercese *et al.* 2012).

During panting, CO₂ excretion occurs at a greater rate than does cellular carbon dioxide (CO₂) production, which alters the standard bicarbonate buffer system in the blood (Fisinin and Kavtarashvili 2015). The reduction of CO₂ leads to a decrease in the concentration of carbonic acids (H₂CO₃) and

hydrogen ions (H⁺). Also, the concentration of bicarbonate ions (HCO₃[−]) increases, thus raising the pH of the blood, that is, the blood becomes alkaline. To manage this scenario and preserve blood pH balance, birds begin a process of increased excretion of bicarbonate ions (HCO₃[−]) and retention of hydrogen ions (H⁺) by the kidneys. Elevated H⁺ alters the acid–base balance, leading to respiratory alkalosis and metabolic acidosis (Wasti *et al.* 2020). This dysregulation can affect eggshell quality, enzymatic functions, tissue protein synthesis and Ca absorption (Truong *et al.* 2023). Such adverse effects can be reduced with the use of phytase, owing to the greater release of nutrients, energy, antioxidant factors and blood pH stability, hence increasing the availability of minerals, such as Ca.

As highlighted by da Silva *et al.* (2009), the efficiency of Ca absorption increases proportionally to the increasing need for this mineral. Although quails are capable of withstanding temperatures of up to 30°C, it has been observed that these birds require greater amounts of vitamins and minerals in their diet, because of changes in their metabolism (Truong *et al.* 2023). In the context of our study, we found that the inclusion of phytase at concentrations of up to 1000 FTU in the diet of quails kept at 30°C resulted in positive impacts on the Ca concentrations in tibias, when compared with other thermal conditions. These findings demonstrated the effectiveness of the enzyme in promoting the release of nutrients in birds. Furthermore, it confirms that at temperatures of 30°C, where the demand for Ca is greater than at 24°C, birds demonstrated a greater efficiency in the use of Ca from the diet. When analysing the relationship between Ca and P in tibias, we observed a decrease in this relationship at phytase concentrations of 1500 FTU. This reduction can be explained by the effect of phytase in increasing the availability of P in diets, which resulted in a reduction in the ratio, because the Ca content did not change.

Immunohistochemistry

In Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), ~10% of the total body Ca is directed daily to the formation of eggshells, as Ca carbonate (Bar 2008; Nys and Le Roy 2018; Stapane *et al.* 2020). The main sources of this mineral for eggshell formation are dietary absorption in the intestine, renal reabsorption, and resorption from bones. Calbindina-D28k is an intracellular ionic Ca (Ca²⁺)-binding protein, which acts as a Ca transporter from the apical membrane to the basolateral membrane and is involved in the mobilisation of Ca²⁺ in the intestine (absorption), kidney (absorption), and in the uterine glands (release) (Wang *et al.* 2022). It demonstrates the ability not only to influence intestinal absorption, but also to modulate the deposition of this mineral in the uterus. This ability potentially affects not only production, but also the quality of the eggshells (Moraes *et al.* 2021).

According to Sugiyama *et al.* (2007), there is a difference in the expression of calbindin-D28K in different intestinal

segments. This is related to the amount of vitamin D receptors (vitamin D receptor, VDR) in their metabolically active form, 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25 (OH) 2D3], in each intestinal segment. Because duodenum is the first anatomical portion of the intestine, it exhibits a more prominent distribution of Ca^{2+} ions intended for absorption than does the jejunum. As a result, it has an increased number of carriers, such as calbindin-D28K, to facilitate more efficient absorption (San *et al.* 2021). This observation is consistent with the findings of studies conducted by Wu *et al.* (1993), Sugiyama *et al.* (2007) and Moraes *et al.* (2021) in laying hens, where a greater positive expression of Ca transporter calbindin-D28K was found in the initial regions of the intestine, and was more pronounced in the duodenum than in the jejunum, especially in the apical portions of the villi.

Located beneath the epithelium, uterine glands are anti-calbindin-D28K positive as they play a crucial role in the production and release of Ca carbonate (CaCO_3), which is produced and released to produce an eggshell in the uterus. This process is influenced by the concentration of circulating oestrogen (Corradino *et al.* 1993) and regulates both egg production and eggshell quality. Uterine gland cells transfer Ca from the basal portion to the apical surface during the synthesis of CaCO_3 (Moraes *et al.* 2021). The greater the amount of CaCO_3 , the faster the egg production will be and/or the better the eggshell quality will be (Stapane *et al.* 2020). The epithelium (pseudostratified ciliated) is not positive for anti-calbindin-D28k, because its function is to produce mucin to help with the transit of the egg.

Our results agree with those of Moraes *et al.* (2021). They found greater anti-calbindin-D28K positivity in the uterine glands of Japanese quail subjected to temperatures of 24°C and 28°C, demonstrating the importance of this area to the mobilisation Ca for the formation of eggshells. They also observed the absence of the Ca transporter in the epithelium of uterine glands.

In our research, we observed that quails, when subjected to thermal-comfort temperatures, showed lower positivity to the calbindin-D28K transporter in the duodenal epithelium. This may be related to a lower demand for Ca absorption because of the environment, because birds in thermal comfort would have less need to absorb large amounts of Ca. Moraes *et al.* (2021) also observed a lower calbindin-D28K positivity in the duodenal epithelium in quail kept at thermoneutral temperatures. As already mentioned, ETC can negatively affect the laying performance of birds, owing to the reduction in FI (Bilal *et al.* 2021) and nutrient utilisation, leading to lower egg production, quality, and shell thickness (Vercese *et al.* 2012; Attia *et al.* 2016). ETC can also influence the reduction in the presence of calbindin-D28k in the duodenum, ileum, caecum, colon, and uterus of birds, causing deterioration in eggshell quality (Ebeid *et al.* 2012; Moraes *et al.* 2021). In the present study, the same effect was also observed in the jejunum of birds subjected to temperatures of 36°C.

Conclusions

Our study demonstrated that phytase supplementation brings benefits to birds, especially for those kept at temperatures of 30°C, given the greater demand for vitamins and minerals, owing to changes in their metabolism. Phytase improved the efficiency of Ca absorption and positively influenced the greater expression of anti-calbindin-D28K in the duodenum and jejunum of the birds. This provided greater mobilisation of Ca to the tibias and a greater total production of eggs for hens kept at that temperature. Furthermore, the results demonstrated that dietary phytase supplementation at 1500 FTU was able to not only minimise the deleterious effects of heat stress (36°C), but also increased shell thickness (better egg quality). These improvements contribute significantly to ensuring the integrity of eggs, promoting greater durability and protection during the handling, storage, and transport phases. Our results suggest that this is best achieved with 1500 FTU of phytase when Japanese quails are exposed to high temperatures.

Supplementary material

Supplementary material is available [online](#).

References

- Adams JE (2009) Quantitative computed tomography. *European Journal of Radiology* 71, 415–424. doi:10.1016/j.ejrad.2009.04.074
- Alagawany M, Farag MR, Abd El-Hack ME, Patra A (2017) Heat stress: effects on productive and reproductive performance of quail. *World's Poultry Science Journal* 73, 747–756. doi:10.1017/S0043933917000782
- Attia YA, Abd El-Hamid AE-HE, Abedalla AA, Berika MA, Al-Harhi MA, Kucuk O, Sahin K, Abou-Shehema BM (2016) Laying performance, digestibility and plasma hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin C, and/or vitamin E supplementation. *SpringerPlus* 5, 1619. doi:10.1186/s40064-016-3304-0
- Baghban-Kanani P, Hosseintabar-Ghasemabad B, Azimi-Youvalari S, Seidavi A, Laudadio V, Mazzei D, Tufarelli V (2020) Effect of dietary sesame (*Sesame indicum* L) seed meal level supplemented with lysine and phytase on performance traits and antioxidant status of late-phase laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 33, 277–285. doi:10.5713/ajas.19.0107
- Bar A (2008) Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 477–490. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.006
- Beggs MR, Alexander RT (2017) Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development. *Experimental Biology and Medicine* 242, 840–849. doi:10.1177/1535370217699536
- Bernardes RD, de Oliveira CH, Arlindo Calderano A, de Sousa Ferreira R, Norais Maia Dias K, Figueiredo de Almeida B, Eleuterio Aleixo P, Teixeira Albino LF (2022) Effect of phytase and protease combination on performance, metabolizable energy, and amino acid digestibility of broilers fed nutrient-restricted diets. *Revista Brasileira de Zootecnia* 51, e20210211. doi:10.37496/rbz5120210211
- Bilal RM, Hassan F-U, Farag MR, Nasir TA, Ragni M, Mahgoub HAM, Alagawany M (2021) Thermal stress and high stocking densities in poultry farms: potential effects and mitigation strategies. *Journal of Thermal Biology* 99, 102944. doi:10.1016/j.jtherbio.2021.102944
- Broch J, Savaris VDL, Wachholz L, Cirilo EH, Tesser GLS, Pacheco WJ, Eyng C, Pesti GM, Nunes RV (2021) Influence of phytate and phytase

- on performance, bone, and blood parameters of broilers at 42 days old. *South African Journal of Animal Science* 51, 160–171. doi:10.4314/sajas.v51i2.3
- Chalmers HJ, Dykes NL, Lust G, Farese JP, Burton-Wurster NI, Williams AJ, Todhunter RJ (2006) Assessment of bone mineral density of the femoral head in dogs with early osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research* 67, 796–800. doi:10.2460/ajvr.67.5.796
- Corradino RA, Smith CA, Krook LP, Fullmer CS (1993) Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. *Endocrinology* 132, 193–198. doi:10.1210/endo.132.1.8419123
- Cowieson AJ, Wilcock P, Bedford MR (2011) Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal* 67, 225–236. doi:10.1017/S0043933911000250
- da Silva RM, Furlan AC, Ton APS, Martins EN, Scherer C, Murakami AE (2009) Calcium and phosphorus requirements of finishing meat quail. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38, 1509–1524. doi:10.1590/S1516-35982009000800015
- da Silva VC, de Sousa Nascimento R, Lopes Neto JP, Riberio Miranda J, de Melo Lopes FF, Furtado DA (2022) Bioclimatic zoning for quails in the dry period in the state of Paraíba, Brazil. *Revista Ceres* 69, 125–130. doi:10.1590/0034-737x202269020001
- Dallmann HM, Avila VS, Krabbe EL, Surek D, Bedendo GC, Toledo TS, Dallmann PR, Roll AAP, Roll VFB, Rutz F (2023) Different phytase levels and energy densities in broiler diets on performance, nutrient digestibility, and bone integrity from 28 to 35 days of age. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 75, 280–292. doi:10.1590/1678-4162-12790
- Dang DX, Chun SG, Kim IH (2022) Feeding broiler chicks with *Schizosaccharomyces pombe*-expressed phytase-containing diet improves growth performance, phosphorus digestibility, toe ash, and footpad lesions. *Animal Bioscience* 35, 1390–1399. doi:10.5713/ab.21.0462
- Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H, Partridge G (2014) Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 878–896. doi:10.1002/jsfa.6998
- Dersjant-Li Y, Evans C, Kumar A (2018) Effect of phytase dose and reduction in dietary calcium on performance, nutrient digestibility, bone ash and mineralization in broilers fed corn-soybean meal-based diets with reduced nutrient density. *Animal Feed Science and Technology* 242, 95–110. doi:10.1016/j.anifeedsci.2018.05.013
- Dersjant-Li Y, Bello A, Stormink T, Abdollahi MR, Ravindran V, Babatunde OO, Adeola O, Toghyani M, Liu SY, Selle PH, Marchal L (2022) Modeling improvements in ileal digestible amino acids by a novel consensus bacterial 6-phytase variant in broilers. *Poultry Science* 101, 101666. doi:10.1016/j.psj.2021.101666
- Ebeid TA, Suzuki T, Sugiyama T (2012) High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. *Poultry Science* 91, 2282–2287. doi:10.3382/ps.2011-01898
- Farias MRS, Leite SCB, Silva HP, Pacheco DB, Alves GC, Abreu CG, Freitas ER (2021) Superdosing phytases in the diets of light laying hens: productive performance and bone quality. *Brazilian Journal of Poultry Science* 23, eRBCA-2020-1395. doi:10.1590/1806-9061-2020-1395
- Fisinin VI, Kavtarashvili ASH (2015) Heat stress in poultry. I. Danger, related physiological changes and symptoms (review). *Agricultural Biology* 50, 162–171. doi:10.15389/agrobiol.2015.2.162eng
- Franzini BD, Cruz LCF, Sampaio SA, Borges KF, Barros HSS, Santana FXC, Gouveia ABVS, Paulo LMD, Minafra CS (2022) Blood hematological and hormonal indicators of stress in poultry. *Research, Society and Development* 11, e16111326303. doi:10.33448/rsd-v11i3.26303
- Gautier AE, Walk CL, Dilger RN (2018) Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol. *Poultry Science* 97, 211–218. doi:10.3382/ps/pex291
- Hirvonen J, Liljavirta J, Saarinen MT, Lehtinen MJ, Ahonen I, Nurminen P (2019) Effect of phytase on in vitro hydrolysis of phytate and the formation of myo-inositol phosphate esters in various feed materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 11396–11402. doi:10.1021/acs.jafc.9b03919
- Hosseini-Vashan SJ, Golian A, Yaghobfar A (2016) Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. *International Journal of Biometeorology* 60, 1183–1192. doi:10.1007/s00484-015-1112-9
- Jankowski J, Mikulski D, Tataro MR, Krupski W (2015) Effects of increased stocking density and heat stress on growth, performance, carcass characteristics and skeletal properties in turkeys. *Veterinary Record* 176, 21. doi:10.1136/vr.102216
- Koelkebeck KW, Harrison PC, Madindou T (1993) Effect of carbonated drinking water on production performance and bone characteristics of laying hens exposed to high environmental temperatures. *Poultry Science* 72, 1800–1803. doi:10.3382/ps.0721800
- Manobhavan M, Elangovan AV, Sridhar M, Shet D, Ajith S, Pal DT, Gowda NKS (2016) Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn-soyabased diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100, 93–100. doi:10.1111/jpn.12341
- Martínez-Vallepeín B, Männer K, Ader P, Zentek J (2022) Evaluation of high doses of phytase in a low-phosphorus diet in comparison to a phytate-free diet on performance, apparent ileal digestibility of nutrients, bone mineralization, intestinal morphology, and immune traits in 21-day-old broiler chickens. *Animals* 12, 1955. doi:10.3390/ani12151955
- Moraes LR, Delicato MEA, Cruz AS, Silva HTFNP, Alves CVBV, Campos DB, Saraiva EP, Costa FP, Guerra RR (2021) Methionine supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. *PLoS ONE* 16, e0245615. doi:10.1371/journal.pone.0245615
- Nys Y, Le Roy N (2018) Calcium homeostasis and eggshell biomineralization in female chicken. In 'Vitamin D. Vol. 1'. 4th edn. (Ed. D Feldman) pp. 361–382. (Academic Press) doi:10.1016/B978-0-12-809965-0.00022-7
- Oliveira JFd, Rossi Júnior JL, Leite FLG, Oliveira DCd, Costa LAVS, Silva ICCd, Teixeira MW, Costa FS (2012) Densitometria da vértebra dorsal, osso pleural e osso neural em tartarugas verdes hígidas por tomografia computadorizada quantitativa. *Ciência Rural* 42, 1440–1445. [In Portuguese with English abstract] doi:10.1590/S0103-84782012000800018
- Pieniazek J, Smith KA, Williams MP, Manangi MK, Vazquez-Anon M, Solbak A, Miller M, Lee JT (2017) Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. *Poultry Science* 96, 370–382. doi:10.3382/ps/pew225
- Pirgozliev V, Bedford MR, Acamovic T, Mares P, Allymehr M (2011) The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. *British Poultry Science* 52, 245–254. doi:10.1080/00071668.2011.560596
- Porto ML, Teófilo TS, Cavalcanti DMLP, Freitas CIA, Oliveira MF, Fontenele-Neto JD (2021) Incubation variables, performance, and morphometry of the duodenal mucosa of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) submitted to different incubation temperatures and thermally challenged after hatching. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 73, 495–507. doi:10.1590/1678-4162-12052
- R Core Team (2022) 'R: a language and environment for statistical computing (ver. 4.2.0).' (R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria) Available at <https://www.R-project.org/>
- Rangana S (1979) 'Manual of analysis of fruit and vegetable products.' 634 pp. (Tata McGraw Hill)
- Rojas IYM, González EA, Menocal JA, Santos TT, Arguello JR, Coello CL (2017) Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum-soybean-meal-based diets. *Journal of Applied Animal Research* 46, 314–321. doi:10.1080/09712119.2017.1299740
- Rostagno MH (2020) Effects of heat stress on the gut health of poultry. *Journal of Animal Science* 98, skaa090. doi:10.1093/jas/skaa090
- Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Teixeira ML, Rodrigues PB, de Oliveira RF, de Toledo Barreto SL, Brito CO (2017) 'Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.' 4th edn. p. 488. (UFV: Viçosa, Brazil) Available at https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4532766/mod_resource/content/1/Rostagno%20et%20al%202017.pdf [Portuguese]

- Sahin N, Balci TA, Kucuk O, Smith MO, Sahin K (2009) Effects of 25-hydroxycholecalciferol and soy isoflavones supplementation on bone mineralisation of quail. *British Poultry Science* **50**, 709–715. doi:10.1080/00071660903261944
- Sampath V, Gao S, Park JH, Kim IH (2023) Exogenous phytase improves growth performance, nutrient retention, tibia mineralization, and breast meat quality in ross-308 broilers. *Agriculture* **13**(10), 1906. doi:10.3390/agriculture13101906
- 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**, e06081. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06081
- Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD (1991) The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Journal of Bone and Mineral Research* **6**, 339–346. doi:10.1002/jbmr.5650060405
- Sens RF, Bassi LS, Almeida LM, Rosso DF, Teixeira LV, Maiorka A (2021) Effect of different doses of phytase and protein content of soybean meal on growth performance, nutrient digestibility, and bone characteristics of broilers. *Poultry Science* **100**, 100917. doi:10.1016/j.psj.2020.12.015
- Sharma NK, Choct M, Wu SB, Smillie R, Morgan N, Omar AS, Sharma N, Swick RA (2016) Performance, litter quality and gaseous odour emissions of broilers fed phytase supplemented diets. *Animal Nutrition* **2**, 288–295. doi:10.1016/j.aninu.2016.10.003
- Silva DJ, Queiroz AC (2006) 'Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.' 3rd edn. (UFV: Viçosa, MG, Brazil)
- Simões de Souza JC, Tavares Fernandes TH, de Albuquerque Bonelli M, Séllos Costa F (2018) Quantitative computed tomography of healthy adult boas (boa constrictor). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **49**, 1012–1015. doi:10.1638/2017-0224.1
- Stapane L, Le Roy N, Ezagal J, Rodriguez-Navarro AB, Labas V, Combes-Soia L, Hincke MT, Gautron J (2020) Avian eggshell formation reveals a new paradigm for vertebrate mineralization via vesicular amorphous calcium carbonate. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 15853–15869. doi:10.1074/jbc.RA120.014542
- Sugiyama T, Kikuchi H, Hiyama S, Nishizawa K, Kusuhara S (2007) Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. *British Poultry Science* **48**, 233–238. doi:10.1080/00071660701302270
- Truong L, Miller MR, Sainz RD, King AJ (2023) Changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) blood gases and electrolytes in response to multigenerational heat stress. *PLoS Climate* **2**, e0000144. doi:10.1371/journal.pclm.0000144
- Vercese F, Garcia EA, Sartori JR, Silva AdP, Faitarone ABG, Berto DA, Molino AdB, Pelicia K (2012) Performance and egg quality of Japanese quails submitted to cyclic heat stress. *Brazilian Journal of Poultry Science* **14**, 37–41. doi:10.1590/S1516-635X2012000100007
- Wang X, Li P, Zhao J, Jiao H, Lin H (2022) The temporal gene expression profiles of calcium and phosphorus transporters in Hy-Line Brown layers. *Poultry Science* **101**, 101736. doi:10.1016/j.psj.2022.101736
- Wasti S, Sah N, Mishra B (2020) Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals* **10**, 1266. doi:10.3390/ani10081266
- Wu JCY, Smith MW, Mitchell MA, Peacock MA, Turvey A, Keable SJ (1993) Enterocyte expression of calbindin, calbindin mRNA and calcium transport increases in jejunal tissue during onset of egg production in the fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **106**, 263–269. doi:10.1016/0300-9629(93)90510-B
- Yan F, Keen CA, Zhang KY, Waldroup PW (2005) Comparison of methods to evaluate bone mineralization. *Journal of Applied Poultry Research* **14**, 492–498. doi:10.1093/japr/14.3.492
- Yan FF, Mohammed AA, Murugesan GR, Cheng HW (2019) Effects of a dietary synbiotic inclusion on bone health in broilers subjected to cyclic heat stress episodes. *Poultry Science* **98**, 1083–1089. doi:10.3382/ps/pey508
- Zhang YN, Wang S, Li KC, Ruan D, Chen W, Xia WG, Wang SL, Abouelezz KFM, Zheng CT (2020) Estimation of dietary zinc requirement for laying duck breeders: effects on productive and reproductive performance, egg quality, tibial characteristics, plasma biochemical and antioxidant indices, and zinc deposition. *Poultry Science* **99**, 454–462. doi:10.3382/ps/pez530
- Zhang H, Majdeddin M, Gaublumme D, Taminiau B, Boone M, Elewaut D, Daube G, Josipovic I, Zhang K, Michiels J (2021) 25-hydroxycholecalciferol reverses heat induced alterations in bone quality in finisher broilers associated with effects on intestinal integrity and inflammation. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **12**, 104. doi:10.1186/s40104-021-00627-6

Data availability. The data used to generate the results in the paper will be shared upon reasonable request to the corresponding author.

Conflicts of interest. The authors declare that they have no other conflicts of interest.

Declaration of funding. The Funding for this research was provided by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Announcement no. 09/2020 – Research Productivity Grants, project no. 309318/2020-3 and Announcement 03/2020 – Research productivity PROPEQ-PRPG/UFPB Project PVNI3248-2020 by through of the Cooperation Agreement by Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Acknowledgements. The authors thank the Center for Agricultural Sciences (CCA) of the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) for the scholarship granted to the first author.

Author affiliations

^AAnimal Science Department, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, Brazil.

^BDepartment of Veterinary Medicine, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^CDepartment of Agroindustrial Management and Technology, Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, PB, Brazil.

**ANEXO C – GENE EXPRESSION OF CALCIUM TRANSPORTERS
CALBINDIN-D28K AND TRPV6 IN JAPANESE QUAILS (*Coturnix japonica*)
SUBJECTED TO PHYTASE SUPER-DOSING AND UNDER DIFFERENT
TEMPERATURES.**



Gene expression of calcium transporters Calbindin-D28K and TRPV6 in Japanese quails (*Coturnix japonica*) subjected to phytase super-dosing and under different temperatures.

Apolônio Gomes Ribeiro^a, Raiane dos Santos Silva^a,
Clara Virgínia Batista de Vasconcelos Alves^b, Danila Barreiro Campos^b,
Dayane Albuquerque da Silva^c, Júlio César dos Santos Nascimento^c,
Edijanio Galdino da Silva^b, Edilson Paes Saraiva^a,
Fernando Guilherme Perazzo Costa^a, Walter Esfrain Pereira^d,
Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho^{e,*}, Ricardo Romão Guerra^a

^a Universidade Federal da Paraíba, Animal Science Department, Areia-PB, Brazil

^b Universidade Federal da Paraíba, Department of Veterinary Sciences, Areia-PB, Brazil

^c Universidade Federal Rural de Pernambuco, Animal Science Department, Recife-PE, Brazil

^d Universidade Federal da Paraíba, Department of Fundamental and Social Sciences, Areia-PB, Brazil

^e Department of Physiology and Pharmacology Karolinska Institutet - Stockholm Sweden Biomedicum, 5B, Solnavägen 9, S-171 77, Stockholm, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Calbindin-D28 K
Calcium transporters
Heat stress
Phytase supplementation
TRPV6

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of phytase super-dosing in the diet of laying quails subjected to different temperatures, their performance, blood biochemistry, and gene expression of the epithelial calcium transporters Calbindin-D28 K and TRPV6. Seven hundred and twenty (720) Japanese quails in the production phase were distributed in a completely randomized design, in a 5×3 factorial scheme, with five levels of phytase supplementation (0, 500, 1000, 1500 and 3000 FTU/kg) and three temperatures (24°C, 30°C and 36°C), totaling 15 treatments, and six replicates of eight birds each. The study began at 8 weeks of age and continued for two 21-day cycles, totaling 42 days of experiment. Performance parameters, serum biochemistry, and gene expression of calbindin-D28 K and TRPV6 were measured through real-time PCR. The data were subjected to analysis of variance, Tukey, and regression. Birds kept at 36°C showed lower feed intake than those kept at 24°C and 30°C. At 30°C, birds had lower serum uric acid levels than birds at 36°C, and higher total egg production, egg mass, and Calbindin-D28 K gene expression in the uterus than those at 24°C and 36°C. Birds kept at 24°C had higher serum calcium and phosphorus levels than those kept at 30°C and 36°C. At a supplementation level of 1500 FTU, phytase provided greater eggshell thickness in quails kept at 36°C and greater calbindin-D28 K gene expression in the kidney. Therefore, the use of 1500 FTU of phytase is recommended for Japanese quail exposed to high temperatures, since phytase overdosage has been shown to be effective in mitigating the negative effects of heat stress.

Introduction

In tropical climates, widely present in much of Brazil, laying hens face significant challenges that weaken their performance (Silva et al., 2022). High temperatures have had an adverse impact on the

zootechnical indices of birds, resulting not only in an increase in the mortality rate, but also negatively affecting the productive and economic results in the poultry industry (Franzini et al., 2022). This condition is especially evident in the breeding of laying quails (*Coturnix japonica*), where eggshell quality is impaired due to calcium restriction,

Poultry Science Section: Metabolism and Nutrition

* Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology Karolinska Institutet - Stockholm Sweden Biomedicum, 5B, Solnavägen 9, S-171 77, Stockholm, Sweden.

E-mail address: lucas.carvalho@ki.se (L.R.R.A. Carvalho).

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.104937>

Received 1 November 2024; Accepted 21 February 2025

Available online 21 February 2025

0032-5791/© 2025 Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

which is negatively impacted by increased temperature (Ebeid et al., 2012; Moraes et al., 2021).

Calcium is predominantly acquired through intestinal absorption, and through bone and renal reabsorption (Beggs and Alexander, 2017). These processes involve the efficient transfer of calcium from the blood to the uterus, with the assistance of two essential calcium transporters in the epithelium, called transient receptor potential vanilloid channel type 6 (TRPV6) and Calbindin-D28k. These transporters play a crucial role in facilitating the mobilization of calcium through intestinal cells (Moraes et al., 2021).

When birds are exposed to high temperature heat stress, they suffer physiological and behavioral changes. These changes have a pronounced impact on food intake and result in structural changes in the intestinal epithelium, impairing the digestibility and absorption of nutrients (Rostagno, 2020). In addition, it is important to consider the adverse effects of anti-nutritional factors such as phytate. This compound not only makes phosphorus and calcium unavailable, but also negatively influences the digestion and absorption of other minerals and amino acids, as well as affecting the energy efficiency of diets (Babatunde et al., 2019; Bernardes et al., 2022; Dallmann et al., 2023). Heat stress, combined with the antinutritional factors of phytate, exacerbate the challenges faced by tropical poultry production, and affect the health and performance of laying hens.

Phytase (*myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase - IP6*) belongs to a class of exogenous enzymes whose function is to degrade the phytate molecule (*inositol hexa-phosphate, IP6*) present in diet ingredients, releasing phosphorus, calcium, and other nutrients to be used by animals (Hirvonen et al., 2019; Sena et al., 2020). The use of higher than usual amounts of phytase is called super-dosing, and has attracted the attention of researchers, since its administration allows for faster and more effective degradation of the phytate molecule present in diets, resulting in the subsequent release of minerals and other nutrients. (Farias et al., 2021).

Studies have demonstrated the beneficial effects of using phytase super-dosing on animal performance (Pirgozliev et al., 2011; Pieniazek et al., 2017; Farias et al., 2021; Martínez-Vallespín et al., 2022), on egg quality, especially shells (Rojas et al., 2017; Farias et al., 2021), and on bone characteristics (Manobhavan et al., 2016; Sharma et al., 2016). It is worth mentioning that these studies were carried out with broilers and laying hens. It is essential to conduct studies evaluating the effects of an super-dosing of phytase in laying quails subjected to high temperatures. In this regard, the objective of this study was to evaluate the effects of an super-dosing of phytase on the parameters of productive performance, serum biochemistry, and gene expression of the calcium transporters Calbindin-D28k and TRPV6 in laying quails subjected to thermoneutral conditions and heat stress.

Material and methods

Experimental site and ethics committee

The experiment was conducted in the climatic chambers belonging to the Department of Animal Science at the Federal University of Paraíba. The project had ethical approval from the Animal Care and Use Committee (CEUA) of the Federal University of Paraíba, Brazil, under the protocol process number (3695120121). Euthanasia was performed by electronarcosis in accordance with the institution's CEUA guidelines.

Animals and experimental design

Seven hundred and twenty (720) Japanese quails in the production phase were used, starting at the eighth week of life, with the egg yield percentage above 95 %. They were distributed in a completely randomized design in a 5 × 3 factorial scheme, with five phytase levels (0, 500, 1000, 1500, and 3000 FTU) and three temperature ranges (24, 30, and 36°C), with six replicates of eight birds each (48 animals per

treatment), representing thermoneutral (24°C) and thermal stress (30 and 36°C) ranges, totaling fifteen treatments. The quails began the treatments at eight weeks of age and remained for two cycles of 21 days, totaling 42 days of experiment.

Housing

The birds were housed in 3 climatic 19.71 m² chambers. Each chamber was equipped with 30 metal cages (55 × 35 × 27 cm), with 1 nipple drinker and 1 trough feeder per cage. The chambers had an air conditioning system, heater, humidifier, dehumidifier, exhaust fan, thermostats, and lighting system. The size of birds/cage was 481.25 cm²/bird. The lighting program provided was 17 h of (artificial) light/day throughout the experimental period.

Diets and experimental treatment

The diets were formulated according to the recommendations of the Brazilian Tables for Poultry and Swine (Rostagno et al., 2017), only varying with phytase supplementation. All diets were formulated with reduced calcium and phosphorus concentrations according to provisions of the enzyme matrix for dietary phytase at 500FTU (0.165 % Ca - 0.150 % P) (Table 1).

Phytase added to the experimental diets was from *Escherichia coli* (*E. coli*) produced in *Thricoderma reesei* (Quantum Blue, AB Vista, Marlborough, UK), replacing part of the inert ingredient in the diets.

The treatments consisted of five diets composed of corn and soybean meal, which were supplied in each climatic chamber (24, 30 and 36°C). T1: Treatment 1 (0FTU) consisted of a negative control diet, without phytase supplementation and with reduced calcium and phosphorus concentrations. T2: Treatment 2 (500FTU) was a balanced diet with the addition of phytase, which followed the recommendations for the use of the phytase nutritional matrix for calcium and phosphorus. The other treatments (T3 - 1000FTU; T4 - 1500FTU; T5 - 3000FTU) contained a super-dose of phytase. The concentrations of phytase were achieved by adding phytase to replace inert material, considering the concentrations in the negative control diet. The birds had access to water and feed *ad libitum* throughout the experimental period.

Productive performance evaluation

The parameters evaluated were feed intake (FI - g/bird/day), total egg production (TEP - %), egg weight (EW - g), egg mass (EM - g/bird/day) and eggshell thickness (ET - mm). The performance evaluation period was divided into two 21-day cycles. At the end of each period, the leftover feed from each plot was collected to calculate feed intake.

Feed intake (FI) was determined by dividing the difference between the feed provided during the treatment phase and the leftover feed weighed at the end of the phase by the number of birds in the plot, and then calculated to obtain the average FI per bird in the plot (g/bird/day).

Eggs were collected twice a day (8:00 a.m. and 3:00 p.m.) and recorded on a laying frequency and mortality form for data correction. Percentage of egg production was obtained by collecting the number of eggs produced daily corrected for mortality, so that the ratio of whole eggs produced was expressed as a percentage for each treatment, over the average number of birds in the period (%/bird/day). This corresponded to the production of marketable eggs.

All whole eggs produced in the last three days of each production cycle were weighed individually by using analytical scales (0.001 g) to obtain the average egg weight, which was then multiplied by the total number of eggs produced in the experimental period, thus obtaining the total egg mass. This mass was divided by the total number of birds per day, and expressed in grams of egg/bird/day.

At the end of each production cycle, four eggs were selected per experimental plot. They were broken in half (equatorial region), the

Table 1

Experimental diets containing five levels of Phytase (0, 500, 1000, 1500, and 3000 FTU) and reduction in phosphorus and calcium levels taking into account the 500 FTU matrix of the enzyme, for Japanese quails in the laying phase.

Treatments		T1	T2	T3	T4	T5
Ingredientes	Unit	0FTU	500FTU	1000FTU	1500FTU	3000FTU
Corn - 7,88 %	g/kg	597	597	597	597	597
Soybean meal 45,22 %	g/kg	305	305	305	305	305
Soybean oil	g/kg	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
DL-methionine	g/kg	3.98	3.98	3.98	3.98	3.98
L-Lysine HCl	g/kg	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65
L-threonine	g/kg	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Limestone	g/kg	74.37	74.37	74.37	74.37	74.37
Dicalcium Phosphate 18,5 %	g/kg	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Common Salt	g/kg	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
Mineral premix ¹	g/kg	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin premix ²	g/kg	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Choline	g/kg	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Antioxidante	g/kg	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Inert ³	g/kg	0.60	0.50	0.40	0.30	0.00
Phytase ⁴	g/kg	0.00	0.10	0.20	0.30	0.60
Total		1000	1000	1000	1000	1000
Nutrients	Unit					
Phytase	FTU/kg	0	500	1000	1500	3000
Metabolizable energy	kcal/kg	2800	2800	2800	2800	2800
Crude protein	g/kg	190.00	190.00	190.00	190.00	190.00
Calcium	g/kg	29.93	29.93	29.93	29.93	29.93
Phosphorus total	g/kg	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94
Available phosphorus	g/kg	1.77	1.77	1.77	1.77	1.77
Potassium	g/kg	7.32	7.32	7.32	7.32	7.32
Sodium	g/kg	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Chlorine	g/kg	3.19	3.19	3.19	3.19	3.19
Mogin number	mEq/kg	164.59	164.59	164.59	164.59	164.59
Digestible amino acid (%)						
Digestible Methionine	g/kg	6.47	6.47	6.47	6.47	6.47
Digestible Methi. + cystine	g/kg	9.08	9.08	9.08	9.08	9.08
Digestible Lysine	g/kg	11.07	11.07	11.07	11.07	11.07
Digestible Threonine	g/kg	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75
Digestible Tryptophan	g/kg	2.07	2.07	2.07	2.07	2.07
Digestible Valine	g/kg	7.98	7.98	7.98	7.98	7.98

The treatments mentioned above were subjected to three different temperatures (24, 30 and 36°C).

¹ Mineral Premix (concentration/kg of product): Mn - 60 g, Fe - 80 g, Zn - 50 g, Cu - 10 g, Co - 2 g, I - 1 g and Se - 250 mg.

² Vitamin Premix (concentration/kg of product): Vit. A - 15 mil UI, Vit. D3 - 1,500,000 UI. Vit. E - wm 15000; Vit.B1 - 2.0 g, Vit. B2 - 4.0 g Vit. B6 - 3.0 g, Vit. B12 - 0015 g, nicotinic acid - 25 g, pantothenic acid - 10 g; Vit.K3 - 3.0 g, folic acid - 1.0 g.

³ Inert = Kaolin.

⁴ Phytase enzyme = 100 grams/ton provides 500 FTUs/kg of feed.

shells were washed and sent to be dried in an oven at 55°C for a period of 24 h. The eggshell thickness (ET) was subsequently analyzed and determined with the aid of a digital micrometer (Mitutoyo, resolution 0.001 mm) on the median line of the egg.

Blood serum biochemistry

For blood biochemistry, the birds were submitted to fasting for 6 h, and then 4 ml of blood was collected from 1 bird per experimental plot by puncturing the jugular vein with a 13 × 0.4 mm needle. The blood was stored in a dry tube with a clot activator (BD Vacutainer® Seco), and after 30 min it was centrifuged at 3,500 rpm in a centrifuge (SL-702/RAF30, Solab) for 1 min to obtain the serum, which was later stored in 2 ml Ependorf tubes and frozen for posterior analysis.

Serum levels of gamma glutamyl transferase (Bioclin Kit, Reference k080-2), alkaline phosphatase (Bioclin Kit, Reference k224-2), phosphorus (Bioclin Kit, Reference #K020-1), calcium (Bioclin Kit, Reference #K051-2), creatine kinase (CK) (Bioclin Kit, Reference #K010-1.1) and uric acid (Bioclin Kit, Reference k139-2) were analyzed at the Clinical Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of the University of Trás-os-Montes and Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal. The clinical biochemistry analyzer respos®920 - DiaSys Diagnostic Systems GmbH - Germany, which uses colorimetry and immunoturbidimetric assay, was used for the analyses.

Organ harvesting

At the end of the 2nd production cycle, 6 birds per treatment were randomly selected and euthanized by electronarcosis for organ collection: small intestine (duodenum, jejunum), kidney, and uterus, for real-time PCR (qPCR) analysis for the calcium transporter Calbindin-D28k. In addition, the collected kidneys were also used for TRPV6 analysis.

Real-time PCR (qPCR) for Calbindin-D28k

Duodenum, jejunum, kidney, and uterus tissue samples were collected from 6 randomly selected animals in each treatment. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and then transferred to an ultra-freezer at -80°C until processing. Tissues were homogenized in lysis buffer, and RNA extraction was performed by using the SV Total RNA Isolation System kit (Promega). The concentration and purity of RNA samples were determined by absorbance ratios 260/280 and 260/230 obtained by using a spectrophotometer (Colibri Microvolume Spectrometer, Titertek Berthold). Reverse transcription was performed by using GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) (Promega) according to the manufacturers' recommendations.

The expression of selected genes was assessed by using a Stratagene Mx3005P qPCR (quantitative polymerase chain reaction) system (Agilent Technologies). Oligonucleotides were obtained from previously published Japanese quail sequences, and HMBS was used as an

endogenous control (Table 2). PCR were performed by using Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix low ROX (Agilent Technologies). Amplification conditions were 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, and 20 s at 60°C; 1 min at 95°; 30 s at 55°, and finally 30 s at 95°C.

Dissociation curve analysis allowed the evaluation of primer specificity. Samples were analyzed in duplicate, and relative quantification (target gene/endogenous control) determined their expression. Data were normalized to a calibrator sample by using the $\Delta\Delta C_t$ method (Pfaffl, 2001) with correction for amplification efficiency.

Statistical analyses

The data were subjected to an Analysis of Variance (ANOVA) using the statistical software R version 4.2.0 (R Core Team, 2022) to determine the effects of different phytase levels and temperature ranges on the measured variables. For variables showing significant differences ($P < 0.05$), Tukey's test was conducted to compare the means across different temperatures. In addition, regression analysis was employed to identify the optimal phytase level.

The variables were analyzed according to the following mathematical model:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

Where:

- Y_{ijkl} = response variable
- μ = overall mean
- α_i = effect of the i th level of phytase
- β_j = effect of the j -th temperature range
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = interaction effect between the i th level of phytase and the j -th temperature range
- ϵ_{ijkl} = random error term associated with each observation, assumed to be normally distributed with mean zero and constant variance in case of significance for phytase the following model was applied:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$$

Where:

- Y_i = the response variable for the i th observation.
- β_0 = the intercept, representing the expected value of Y when phytase is at zero (baseline level).
- X_i = phytase level for the i th observation.
- β_1 = the slope, indicating the effect of a one-unit increase in phytase on the response variable.
- ϵ_i = random error term for the i th observation, assumed normally distributed with mean zero and constant variance.

Results

Performance

In the results of feed intake (FI - g/bird/day), total egg production (TEP - %), egg weight (EW - g), egg mass (EM - g/bird/day), and eggshell

thickness (ET - mm) (Table 3), we can observe a significant effect for feed intake, only among the temperatures analyzed ($p < 0.0001$). In them, the animals submitted to a temperature of 36°C had lower feed intake when compared to the animals submitted to the other temperatures (24 and 30°C).

For total egg production ($p < 0.0001$) and egg mass ($p < 0.0001$), we also noticed effects only among the temperatures analyzed, highlighting that the animals subjected to temperatures of 30°C obtained greater total production and egg mass, when compared to animals subjected to other temperatures (24 and 36°C).

For the ET variable, we can observe a significant effect in the interaction between phytase levels vs. temperature ($P < 0.0001$) on the shell thickness variable. We can observe that birds not supplemented with Phytase at higher temperatures (30 and 36°C) have lower ET when compared to birds at comfort temperature (24°C). However, when furnished in the diet, phytase provided a better ET mainly at higher temperatures (30 and 36°C), obtaining even a higher ET at a level of 1500 FTU at the temperature of 36°C. No significant effect was observed for the other variables analyzed.

Serum biochemistry

For the variables of Gamma Glutamyl Transferase (GGT); Alkaline Phosphatase (ALP); Phosphorus (P); Calcium (Ca); Creatine Kinase (CK) and Uric Acid (UA) (Table 4), we can observe an effect for ALP among the analyzed temperatures. When subjected to temperatures of 36°C, birds had higher values for ALP compared to 24°C and 30°C ($p = 0.01$). An increasing linear effect was also observed (Table 6) for the levels of ALP ($p = 0.0404$) as the levels of phytase in the diets increased.

The results obtained for P and Ca demonstrated an effect only for temperatures. Animals subjected to temperatures of 24°C presented higher values for P and Ca compared to birds subjected to temperatures of 30 and 36°C.

Regarding blood UA concentration, we observed a significant impact ($P = 0.01$) in the interaction between temperatures and phytase concentrations. When added to the birds' diets, the phytase enzyme provided similar UA values, except at the temperature of 30°C at a level of 1000 FTU, where the animals presented lower UA values. A decreasing linear effect (Table 6) in UA concentrations ($P = 0.0508$) was also observed in birds kept at temperatures of 36°C as the enzyme levels in the birds' diets increased.

Calbindin-D28 K and TRPV6 gene expression

The results of Calbindin-D28 K gene expression (Table 5) revealed a significant quadratic effect ($P = 0.0202$) of phytase concentrations on gene expression in the kidneys (Fig. 1). Increasing the dietary phytase, Calbindin-D28 K expression also increased, reaching its peak at 2500 FTU of phytase (Table 6). No effect was observed for the different temperatures analyzed.

The expression of Calbindin-D28 K in the quail uterus was affected only by the different temperatures analyzed ($P = 0.0013$). Birds exposed to severe heat stress (36°C) showed lower expression of the gene compared to those kept at 24°C and 30°C (Fig. 2). In the other tissues analyzed, no significant effect on gene expression was observed.

Table 2
Sequence of oligonucleotides used for quantitative PCR.

Genes	qPCR primers (5'–3')	GenBank number	Product size
CALBINDIN28	>GACGGCAATGGGTACATGGA <TCGGGTGTTAAGTCCAAGCC	XM_015855985.1	98 bp
TRPV6	>CCATCATTGCCACCCTCCTT <AGCAACAATCTGGGCTCTCC	XM_015873874.1	107 bp
HMBS	>TGACCTGGTAGTTCACTCCTT <TTGCAATAGCACCAATGGTAAAG	XM_015872688.2	123 bp
	> = forward; < = reverse		

Table 3

Mean values of feed intake (FI), total egg production (TEP), egg weight (EW) Egg mass (EM) and Eggshell thicknesses (ET) of Japanese quails fed with different doses of phytase and subjected to three temperatures.

Parameters	Temperature	Phytase (FTU/Kg)					Mean	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Phytase	Temp x Phy	Regression
FI, g/bird/day	24	18.931	19.701	19.596	19.484	19.849	19.512a	7.737	<0.0001	0.3491	0.9608	NS
	30	19.705	19.978	20.309	19.997	19.407	19.879a					
	36	15.024	16.179	16.484	16.118	15.471	15.855b					
	Mean	17.887	18.619	18.796	18.533	18.242						
TEP, %	24	66.013	66.749	68.071	70.074	65.365	67.254b	11.670	<0.0001	0.7607	0.9266	NS
	30	80.549	76.297	82.280	80.740	77.122	79.398a					
	36	66.379	64.943	64.313	61.510	62.570	63.943b					
	Mean	70.980	69.330	71.555	70.775	68.352						
EW, g	24	10.560	11.109	11.058	10.875	11.103	10.941	17.034	0.3002	0.3903	0.3168	NS
	30	10.818	10.967	10.553	10.963	10.999	10.860					
	36	9.267	9.666	12.624	9.957	9.823	10.268					
	Mean	10.215	10.581	11.412	10.599	10.642						
EM, g/bird/day	24	6.955	7.413	7.519	7.619	7.241	7.349b	21.494	<0.0001	0.4463	0.7208	NS
	30	8.711	8.369	8.680	8.851	8.470	8.616a					
	36	6.209	6.288	8.297	6.129	6.170	6.619b					
	Mean	7.292	7.357	8.165	7.533	7.294						
ET, mm	24	0.427a	0.406a	0.410a	0.404b	0.406a	0.411	3.6018	0.1180	0.0329	<0.0001	NS
	30	0.402b	0.395a	0.411a	0.399b	0.407a	0.403					
	36	0.387b	0.398a	0.394a	0.443a	0.412a	0.407					
	Mean	0.405	0.399	0.405	0.415	0.408						

CV% = Coefficient of variation; NS = Not significant. Means followed by different letters in the columns compare temperatures within each phytase concentration, by Tukey's test ($p < 0.05$). Treatment 1 (0FTU); Treatment 2 (500FTU); Treatment 3 (1000FTU); Treatment 4 (1500FTU); Treatment 5 (3000FTU).

Table 4

Gamma Glutamyl Transferase (GGT); Alkaline Phosphatase (ALP); Phosphorus (P); Calcium (Ca); Creatine Kinase (CK); Uric Acid (UA), of Japanese quails fed diets containing phytase super-dosing and subjected to different temperatures.

Parameters	Temperature	Phytase (FTU/Kg)					Mean	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Phytase	Temp x Phy	Regression
GGT (U/L)	24	0.37	1.38	3.34	5.22	0.58	2.18	25.89	0.84	0.28	0.60	NS
	30	0.67	4.12	1.10	0.37	0.66	1.38					
	36	0.67	7.30	1.10	0.52	0.41	1.99					
	Mean	0.57	4.27	1.85	2.03	0.55						
ALP (U/L)	24	260.6	303.8	262.7	260.0	303.9	278.2B	27.98	0.01	0.01	0.91	0.0404*
	30	199.1	300.5	212.1	223.8	321.7	251.5B					
	36	284.6	392.6	314.5	354.9	369.8	343.3A					
	Mean	248.1	332.3	263.1	279.6	331.8						
P (mg/dl)	24	5.20	5.05	5.22	5.71	5.29	5.29A	19.38	0.01	0.82	0.83	NS
	30	4.61	4.54	4.38	4.16	4.84	4.50B					
	36	4.92	4.47	3.91	4.22	4.20	4.34B					
	Mean	4.91	4.68	4.50	4.70	4.77						
Ca (mg/dl)	24	19.18	18.12	18.50	21.45	19.88	19.42A	12.00	0.02	0.19	0.17	NS
	30	18.73	16.05	17.62	19.01	16.34	17.55B					
	36	17.28	16.68	16.92	15.65	17.40	16.78B					
	Mean	18.40	16.95	17.68	18.70	17.87						
CK (U/L)	24	770.7	564.4	748.6	539.4	660.5	656.7	26.61	0.94	0.05	0.37	NS
	30	741.6	740.2	748.3	485.1	674.2	677.9					
	36	521.2	683.2	755.7	567.6	799.6	665.5					
	Mean	677.8	662.6	750.9	530.7	711.4	677.8					
UA (mg/dl)	24	3.49A	2.78A	3.99A	3.87A	3.24A	3.47	20.14	0.02	0.15	0.01	NS
	30	3.28A	2.75A	2.41B	3.14A	3.25A	2.97					
	36	4.04A	3.60A	3.93A	3.01A	3.23A	3.56					
	Mean	3.60	3.04	3.44	3.34	3.24						

CV% = Coefficient of variation; NS = Not significant. Means followed by different letters in the columns compare temperatures within each phytase concentration by Tukey's test ($p < 0.05$). * Linear Effect (ALP; $y = 0.0185x + 268.75$; $R^2: 0.2972$); * Linear Effect (UA; $y = -0.0003x + 3.8874$; $R^2: 0.4993$); Treatment 1 (0FTU); Treatment 2 (500FTU); Treatment 3 (1000FTU); Treatment 4 (1500FTU); Treatment 5 (3000FTU).

Regarding the expression of TRPV6 in the kidneys of quails (Table 7), no significant effect was observed for the temperatures evaluated, nor on the interaction or regression.

Discussion

Performance parameters

Heat stress (HS) has been a growing concern for poultry producers, especially in tropical climate regions, due to its detrimental impacts on laying hens. This type of stress causes a series of physiological changes, such as oxidative stress, acid-base imbalance, and compromised immune

Table 5
Calbindin-D28 K gene expression in the duodenum, jejunum, kidneys, and uterus of Japanese quails fed diets containing phytase super-dosing and subjected to different temperatures.

Parameters	Temperature	Phytase (FTU/Kg)					Mean	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Phytase	Temp x Phy	Regression
Expression												
Duodenum	24	0.53	0.55	0.32	0.56	0.46	0.48	15.90	0.4650	0.3016	0.8182	NS
	30	0.13	0.28	0.28	0.72	0.60	0.40					
	36	0.21	0.39	0.31	0.50	0.26	0.33					
	Mean	0.29	0.41	0.31	0.59	0.44						
Jejunum	24	0.73	1.00	0.83	1.48	0.96	1.00	21.40	0.1619	0.0185	0.9935	NS
	30	0.44	0.74	0.87	1.71	0.58	0.87					
	36	0.32	0.54	0.60	1.08	0.37	0.58					
	Mean	0.49	0.76	0.77	1.43	0.64						
Kidney	24	0.47	0.74	0.47	0.85	0.40	0.58	14.30	0.4069	0.0311	0.8788	0.0202**
	30	0.18	0.46	0.44	0.75	0.31	0.43					
	36	0.22	0.36	0.45	0.75	0.64	0.48					
	Mean	0.29	0.52	0.45	0.78	0.45						
Uterus	24	0.51	0.36	0.67	0.51	0.20	0.45a	14.10	0.0013	0.7033	0.6184	NS
	30	0.30	0.26	0.21	0.50	0.47	0.35a					
	36	0.08	0.06	0.06	0.17	0.04	0.08b					
	Mean	0.30	0.23	0.31	0.39	0.24						

CV% = Coefficient of variation; NS = Not significant. Means followed by different letters in the columns compare temperatures within each phytase concentration by Tukey's test ($p < 0.05$). ** Quadratic Effect ($y = -1E-07 \times 2 + 0.0005x + 0.2805$; $R^2: 0.6973$), Maximum Point 2500 FTU. Treatment 1 (0FTU); Treatment 2 (500FTU); Treatment 3 (1000FTU); Treatment 4 (1500FTU); Treatment 5 (3000FTU).

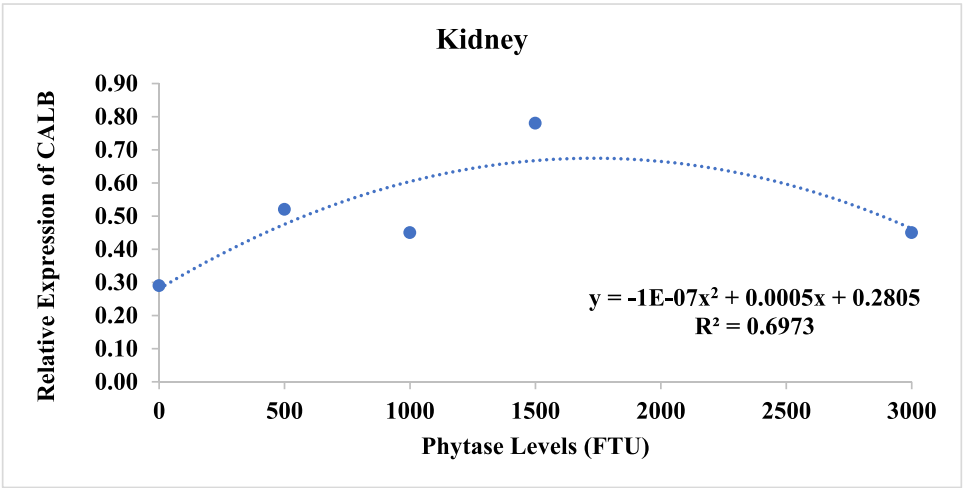


Fig. 1. Expression of the Calbindin-D28 K gene in the kidneys of Japanese quails fed different doses of phytase and subjected to three temperatures.

Table 6
Regression equations of the parameters of alkaline phosphatase (ALP); uric acid (UA) and expression of Calbindin-D28 K in the kidney of Japanese quails fed diets containing phytase super-dosing, in different thermal environments.

Parameter	Effect	Equation	R ²	Level
ALP (U/L)	Linear	$y = 0,0185x + 268,75$	0,2972	-
UA (mg/dl)	Linear	$y = -0,0003x + 3,8874$	0,4993	-
Kidney	Quadrático	$y = -1E-07 \times 2 + 0,0005x + 0,2805$	0,6973	2500 FTU Max

system. These changes result in increased mortality rate, decreased feed efficiency, and reduction in body weight, feed intake, egg production, and bone development (Ribeiro et al., 2024).

In our research, exposing birds to high temperatures proved to be highly detrimental to production. Quails subjected to severe heat stress (36°C) showed a significant reduction in feed intake, resulting in insufficient intake of nutrients and vitamins, which are essential for bird development, especially with regard to bone formation. The effect of temperature on feed intake (FI) was similar to that found by Santos et al.

(2019), who reported a reduction in the intake of Japanese quails exposed to high temperatures (35°C). Similarly, Li et al. (2015) and Kapetanov et al. (2015) reported that during heat stress, hens reduced feeding time to decrease heat production, which may indicate reduced FI. When evaluating the effect of heat stress on laying quails (*Coturnix coturnix japonica*), Akdemir et al. (2019), stated that birds exposed to 34°C had lower feed intake, lower egg production and weight, in addition to worse feed conversion.

For laying quails, the thermal comfort range is between 21°C and 27°C (Alagawany et al., 2017). In our research, we observed that animals exposed to 30°C presented greater total production and egg mass compared to those kept at 24°C and 36°C. This finding is interesting because, although 30°C is outside the comfort range, it seems to provide a condition in which quails can optimize their production, possibly due to their greater tolerance to heat. Unlike laying hens and broilers, laying quails have a more favorable surface area:body volume ratio, which increases their ability to dissipate endogenous heat (Porto et al., 2021). Even though 30°C is above ideal, they can tolerate this temperature, although they need a greater intake of vitamins and minerals to compensate for the metabolic changes caused by heat stress (Truong

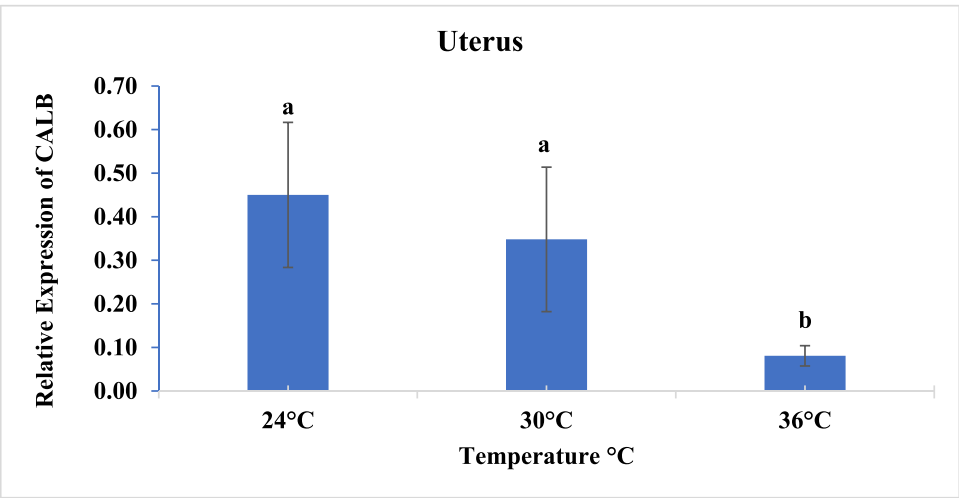


Fig. 2. Expression of the Calbindin-D28 K gene in the uterus of Japanese quails fed different doses of phytase and subjected to three temperatures.

Table 7
TRPV6 gene expression in the kidney of Japanese quails fed diets containing phytase super-dosing and subjected to different temperatures.

Parameters	Temperature	Phytase (FTU/Kg)					Mean	CV%	p-Value			
		0	500	1000	1500	3000			Temperature	Phytase	Temp x Phy	Regression
Expression	24	0.359	0.718	0.514	0.475	0.534	0.520	14.00	0.0947	0.1611	0.5555	NS
	30	0.177	0.258	0.481	0.770	0.244	0.386					
	36	0.164	0.253	0.246	0.385	0.372	0.284					
	Mean	0.233	0.410	0.414	0.544	0.384						

CV% = Coefficient of variation; NS = Not significant. Means followed by different letters in the columns compare temperatures within each phytase concentration by Tukey's test ($p < 0.05$). Treatment 1 (0FTU); Treatment 2 (500FTU); Treatment 3 (1000FTU); Treatment 4 (1500FTU); Treatment 5 (3000FTU).

et al., 2023).

Several nutritional strategies have been used to mitigate the negative effects of HS on bone health in birds (Hosseini-Vashan et al., 2016; Yan et al., 2019; Zhang et al., 2021; Ribeiro et al., 2024). Phytase stands out as a proposal to mitigate the effects of heat stress, because in addition to enabling the degradation of the phytate molecule present in the ingredients of the diets, releasing phosphorus and calcium (Hirvonen et al., 2019), important for the body and bone development of animals (Lee et al., 2019), it also releases minerals and vitamins in the process, such as zinc and vitamin D, which are linked to bone development (Zhang et al., 2020, 2021) and also act as antioxidant factors, removing free radicals and protecting cell membranes from oxidative stress caused by high temperatures (Ribeiro et al., 2024).

The use of increasing concentrations of phytase in our study had a positive impact on eggshell thickness, a result directly associated with the increased availability and retention of essential minerals, such as calcium and phosphorus, provided by the action of phytase in the breakdown of phytate. In addition, dietary supplementation with 1500 FTU of phytase not only minimized the deleterious effects of heat stress (36°C), but also improved egg quality by increasing eggshell thickness.

Blood biochemistry

The evaluation of serum biochemical parameters is essential to understand the physiological responses of quails under different environmental and dietary conditions. Gamma-glutamyl transferase (GGT), a membrane enzyme mainly associated with the biliary and renal epithelia in birds, is a relevant marker for monitoring liver function. In our research, serum GGT levels remained within the normal range for birds (0-10 U/L) (Scholtz et al., 2009; Rezende, 2017), suggesting the absence of active liver injury in quails, even under heat stress conditions. Another important marker is alkaline phosphatase (ALP), a key

enzyme in calcium and phosphorus metabolism in birds. It plays an important role in chondrogenic (cartilage formation) and osteoblastic (bone formation) activities, essential for the proper growth of these species. ALP has low activity in the liver of birds, and its increase in serum or blood plasma is strongly associated with osteoblastic activity and various bone changes, such as accelerated growth, fracture consolidation, osteomyelitis, secondary nutritional hyperparathyroidism, and neoplasms (Barbosa et al., 2011).

Under heat stress, bone metabolism in Japanese quails can be significantly affected, resulting in elevations in alkaline phosphatase (ALP) levels. This increase can be attributed to two main factors: the intensification of osteoblastic activity, which is responsible for the formation of new bone tissue, and the release of ALP by bone cells in response to stress. Elevated osteoblastic activity may occur as an attempt by the body to compensate for the mobilization of calcium and phosphorus, which are essential for the formation of the eggshell, and may be compromised in conditions of extreme heat (Franzini et al., 2022).

The inclusion of phytase in diets can significantly improve the bioavailability of phosphorus and calcium, since the enzyme breaks down the phytic acid present in plant ingredients, releasing inorganic phosphorus and calcium that can be absorbed and used by the body. This increase in the availability of calcium and phosphorus stimulates bone metabolism, promoting adequate bone mineralization and, consequently, increasing the activity of enzymes related to this process, such as alkaline phosphatase. The increasing linear effect on ALP levels with increasing phytase levels observed in our study can be attributed to the greater release of calcium and phosphorus by the action of the phytase enzyme, which improves the availability of these essential minerals for bone metabolism, favoring the development and maintenance of skeletal health in birds.

For laying quails, calcium (Ca) and phosphorus (P) are essential, and their availability is most crucial during the laying period. Calcium and

phosphorus, among all minerals, play a fundamental role in the construction of the skeleton, constituting 80 to 85 % of its structure. They are essential in the formation of eggshells and muscle development. Thus, these minerals are indispensable for the proper functioning of the animal's body (Ribeiro et al., 2024).

In our study, serum Ca and P levels of birds kept at temperatures of 30 and 36°C were slightly below the recommendations (Ca: 20 to 30 mg/dL and P: 5 to 7 g/L) (Thrall et al., 2004). This may be explained by the fact that in high temperature environments (36°C), birds tend to reduce feed intake, thus limiting the availability of calcium and phosphorus in the diet. This decrease in intake may affect variations in the absorption and mobilization of these minerals in the blood, since calcium and phosphorus are essential for several physiological functions, including eggshell formation and maintenance of bone health.

When evaluating the effects of acute and chronic heat stress on performance, egg quality, body temperature and blood gas parameters of laying hens, Barrett et al. (2019), observed that, under heat stress, birds tend to have reduced serum Ca levels. Similar results were found in studies with laying hens subjected to heat stress, which demonstrated a decrease in plasma P concentrations in animals exposed to temperatures of 34°C, indicating the occurrence of severe heat stress (Wolfenson et al., 1987; Ait-Boulahsen et al., 1993; Usayran et al., 2001; Persia et al., 2003).

On the other hand, although quails are able to withstand temperatures of up to 30°C, these birds require greater amounts of vitamins and minerals in their diet due to changes in their metabolism (Ribeiro et al., 2024). In this sense, the lower serum levels of Ca and P observed in animals subjected to a temperature of 30°C indicate a greater use of nutrients by the birds to maintain their normal metabolism, since the performance of the birds at this temperature was not inferior to that observed at 24°C.

When evaluating the effect of three temperature ranges (24, 30, and 36°C) on Japanese quails, Ribeiro et al. (2024), confirmed that, at 30°C, the birds showed greater efficiency in the use of dietary calcium compared to those exposed to 24°C, due to a greater demand for this mineral. These findings are in agreement with the results found in our study, demonstrating that quails have a remarkable capacity to adapt to thermal variations, adjusting their metabolism to optimize the use of essential nutrients, such as calcium and phosphorus.

This adaptive capacity is also reflected in the general health status of the birds, including renal function. Uric acid concentrations, which are indicative of renal functionality, were within normal levels in our study (<15 mg/dL) (Thrall et al., 2004; Farias et al., 2021), suggesting that despite the heat stress conditions, the quails were able to maintain adequate renal function. Since uric acid is one of the main indicators of renal tubule integrity, maintaining normal levels reinforces the resilience of birds in situations of thermal variation, without compromising renal health. Furthermore, the results of our study showed that dietary supplementation with phytase not only minimized the negative effects of heat stress (36°C), but, at a level of 1500 FTU at the same temperature, also reduced serum uric acid levels in birds, promoting better renal health even under heat stress conditions.

Calbindin-D28 K gene expression

Calbindin has been described in studies in its two main forms: calbindin-D9 K, a low molecular weight protein present in the intestine of mammals, and calbindin-D28 K, a high molecular weight protein found in the kidney of mammals (Fleet and Schoch, 2010), as well as in the brain, kidney, intestine, and uterus of birds (Bar, 2009; Fleet and Schoch, 2010) where it facilitates the transport of calcium during the formation of the eggshell (Moraes et al., 2021).

Specifically, calbindin-D28k is an intracellular ionic Ca-binding protein (Ca^{2+}), that acts as a Ca transporter from the apical membrane to the basolateral membrane and is involved in Ca^{2+} mobilization in the intestine (absorption), kidney (absorption), and uterine glands (release)

(Wang et al., 2022). It demonstrates the ability not only to influence intestinal absorption, but also to modulate the deposition of this mineral in the uterus. This ability potentially affects not only the production, but also the quality of eggshells (Ribeiro et al., 2024).

In the present study, Calbindin-D28 K gene expression was observed in the intestine in all treatments analyzed, corroborating previous findings on its presence in laying hens (Wasserman e Taylor, 1966; Moraes et al., 2021). However, no changes in Calbindin-D28 K gene expression were detected in response to increased temperature or increased phytase levels in the diets. These results suggest that, despite exposure to heat stress, there was no significant change in Calbindin-mediated calcium transport in the intestine. In agreement with our results, Moraes et al. (2021), when investigating the effect of four temperature ranges (20, 24, 28, and 32°C) in laying quails, also found that increased temperature did not influence Calbindin-D28 K gene expression in the intestine of these birds.

The kidney is a crucial organ in the dynamic regulation of mineral homeostasis during the oviposition cycle. It plays a central role in the reabsorption and excretion of calcium and phosphorus. It guarantees the balance of these minerals in the blood, ensuring that adequate levels are maintained to support physiological demands such as eggshell formation and maintenance of bone health (Sinclair-Black et al., 2024). The results of this study indicate that in the kidney, Calbindin-D28 K gene expression was positively modulated by dietary phytase levels. The inclusion of phytase is essential for the breakdown of the phytate molecule (the main storage form of phosphorus in plant ingredients), releasing not only phosphorus but also increasing the availability of other important nutrients, such as calcium, other minerals, and vitamins. Among these vitamins, D3 in its metabolically active form, 1,25(OH) $_2$ D $_3$, is crucial for the absorption and utilization of calcium by birds (Moraes et al., 2021; Ribeiro et al., 2024).

In the kidneys, when 1,25(OH) $_2$ D $_3$ binds to VDR (Vitamin D Receptor), it activates this molecule, allowing it to move from the cytoplasm to the cell nucleus, where it binds to specific regions of DNA (Chacar et al., 2020; Wu et al., 2022). This interaction stimulates the expression of genes responsible for calcium absorption, such as Calbindin-D28 K, which plays a fundamental role in the transport and regulation of calcium in kidney cells, facilitating the reabsorption of this mineral, which is essential for maintaining bone health and egg production (Moraes et al., 2021). In our study, increasing levels of phytase supplementation was effective in elevating the expression of this transporter. 1500 FTU provided the highest level of Calbindin-D28 K expression in quail kidneys.

The uterus is an essential organ in the formation of the eggshell, acting in the mobilization and deposition of calcium, mainly in the form of calcium carbonate (CaCO_3), for the mineralization of the shell (Andrade et al., 2023). This process is essential to ensure the rigidity and integrity of the shell, providing adequate protection to the eggs. For uterine tissue, the gene expression of Calbindin-D28k was affected by temperatures. At high temperatures (36°C), there is a reduction of the presence of the calcium transporter Calbindin-D28 K in the uterus, due to the lower conversion of vitamin D3 into its metabolically active form, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Moraes et al., 2021). This metabolite is essential for the absorption and utilization of calcium, and heat stress compromises this process, resulting in lower expression of Calbindin-D28 K in the uterus, which affects calcium deposition in eggshell formation (Ebeid et al., 2012). Our findings confirm that at elevated temperatures, Calbindin-D28 K expression is reduced, which impairs calcium deposition in eggshell formation and impacts its quality.

TRPV6 gene expression

The TRPV6 ion channel (Transient Receptor Potential Vanilloid Channel Type 6) acts as an epithelial calcium channel in organs and glands characterized by high demand for calcium transport. According to some studies (Brown et al., 2005; Bianco et al., 2007), this ion channel

has a facilitating effect on the entry of calcium into epithelial cells, expressed in the intestinal and renal absorption and reabsorption epithelia, but there is still little information about its expression pattern in laying quails (Moraes et al., 2021). In the present study, TRPV6 gene expression was observed in the kidney in all treatments analyzed, corroborating previous findings on its presence in laying quails (Moraes et al., 2021). However, no changes in TRPV6 gene expression were detected in response to increased temperature or to the effect of phytase doses used. Thus, even with phytase supplementation or temperature variations, TRPV6 may not require a greater expression to maintain efficient calcium absorption.

Conclusion

Phytase supplementation brought significant benefits to birds, especially those kept at temperatures of 30°C, due to the increased demand for vitamins and minerals caused by metabolic changes. Phytase improved the efficiency of calcium (Ca) absorption by stimulating increased expression of calbindin-D28 K in the kidneys, which favored increased Ca reabsorption to be used in total egg production. In addition, dietary supplementation with 1500 FTU of phytase not only minimized the deleterious effects of heat stress (36°C), but also increased eggshell thickness, improving egg quality, reducing serum uric acid levels, and reflecting on better kidney health.

Disclosures

The authors declare that they have no known competing financial or personal interest that could have impact the outcome of the study reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank the Center for Agricultural Sciences (CCA) of the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) for the scholarship granted for the first author.

References

- Ait-Boulahsen, A., Garlich, J.D., Edens, F.W., 1993. Calcium deficiency and food deprivation improve the response of chickens to acute heat stress. *J. Nutr.* 123, 98–105. <https://doi.org/10.1093/jn/123.1.98>.
- Akdemir, F., Köseman, A., Şeker, I., 2019. *Alchemilla vulgaris* effects on egg production and quality expressed by heat-stressed quail during the late laying period. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 49, 1–12. <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i5.8>.
- Alagawany, M., Farag, M.R., ABD El-Hack, M.E., Patra, A., 2017. Heat stress: effects on productive and reproductive performance of quail. *World. Poult. Sci. J.* 73, 747–756. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000782>.
- Andrade, K.G., Cruz, F.K., Kaneko, I.N., Nascimento, M.C., Iwaki, L.C., 2023. Santos. Daily egg-cycle in Japanese quail: serum biochemistry, bones, and oviduct changes. *Braz. J. Poult. Sci.* 25, 001–012. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1599>.
- Babatunde, O.O., Cowieson, A.J., Wilson, J.W., Adeola, O., 2019. The impact of age and feeding length on phytase efficacy during the starter phase of broiler chickens. *Poult. Sci.* 98, 6742–6750. <https://doi.org/10.3382/ps/pez390>.
- Bar, A., 2009. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 152, 447–469. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.020>.
- Barbosa, T.S., Mori, C.K., Polônio, L.B., Ponsano, E.H.G., Ciarlini, P.C., 2011. Serum biochemical profile of laying hens in the region of Araçatuba. *SP. Semina: Ciênc. Agrár.* 32, 1583–1587. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1583>.
- Barrett, N.W., Rowland, K., Schmidt, C.J., Lamont, S.J., Rothschild, M.F., Ashwell, C.M., Persia, M.E., 2019. Effects of acute and chronic heat stress on the performance, egg quality, body temperature, and blood gas parameters of laying hens. *Poult. Sci.* 98, 6684–6692. <https://doi.org/10.3382/ps/pez541>.
- Beggs, M.R., Alexander, R.T., 2017. Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 242, 840–849. <https://doi.org/10.1177/1535370217699536>.
- Bernardes, R.D., Oliveira, C.H., Calderano, A.A., Ferreira, R.S., Dias, K.M.M., Almeida, B. F., Aleixo, P.E., Albino, L.F.T., 2022. Effect of phytase and protease combination on performance, metabolizable energy, and amino acid digestibility of broilers fed nutrient-restricted diets. *Rev. Bras. Zootec.* 51, e20210211. <https://doi.org/10.37496/rbz5120210211>.
- Bianco, S.D., Peng, J.B., Takanaga, H., Suzuki, Y., Crescenzi, A., Kos, C.H., Zhuang, L., Freeman, M.R., Gouveia, C.H.A., Wu, J., Luo, H., Mauro, T., Brown, E.M., Hediger, M.A., 2007. Marked disturbance of 99calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *J. Bone Miner. Res.* 22, 274–285. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061110>.
- Brown, A.J., Krits, I., Armbricht, H.J., 2005. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch. Biochem. Biophys.* 437, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.007>.
- Chacar, F.C., Kogika, M.M., Zafalon, R.V.A., Brunetto, M.A., 2020. Vitamin D metabolism and its role in mineral and bone disorders in chronic kidney disease in humans, dogs, and cats. *Metabolites* 10, 499. <https://doi.org/10.3390/metabo10120499>.
- Dallmann, H.M., Avila, V.S., Krabbe, E.L., Surek, D., Bedendo, G.C., Toledo, T.S., Dallmann, P.R., Roll, A.A.P., Roll, V.F.B., Rutz, F., 2023. Different phytase levels and energy densities in broiler diets on performance, nutrient digestibility, and bone integrity from 28 to 35 days of age. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 75, 280–292. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12790>.
- Ebeid, T.A., Suzuki, T., Sugiyama, T., 2012. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. *Poult. Sci.* 91, 2282–2287. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01898>.
- Farias, M.R.S., Leite, S.C.B., Silva, H.P., Pacheco, D.B., Alves, G.C., Abreu, C.G., Freitas, E.R., 2021. Superdosing phytases in the diets of light laying hens: productive performance and bone quality. *Braz. J. Poult. Sci.* 23, 001–010. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1395>.
- Fleet, J.C., Schoch, R.D., 2010. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 47, 181–195. <https://doi.org/10.3109/10408363.2010.536429>.
- Fransini, B.D., Cruz, L.C.F., Sampaio, S.A., Borges, K.F., Barros, H.S.S., Santana, F.X.C., Gouveia, A.B.V.S., Paulo, L.M., Minafra, C.S., 2022. Blood hematological and hormonal indicators of stress in poultry. *Res. Soc. Dev.* 11, e16111326303. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26303>.
- Hirvonen, J., Liljavirta, J., Saarinen, M.T., Lehtinen, M.J., Ahonen, I., Nurminen, P.I., 2019. Effect of phytase on in vitro hydrolysis of phytate and the formation of myoinositol phosphate esters in various feed materials. *J. Agric. Food Chem.* 67, 11396–11402. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03919>.
- Hosseini-Vashan, S.J., Golian, A., Yaghobfar, A., 2016. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. *Int. J. Biometeorol.* 60, 1183–1192. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1112-9>.
- Kapetanov, M., Pajic, M., Ljubojevic, D., Pelic, M., 2015. Heat stress in the poultry industry. *Arch. Vet. Med.* 8, 87–101. <https://doi.org/10.46784/e-avm.v8i2.117>.
- Lee, S.A., Nagalakshmi, D., Raju, M.V.L.N., Rao, S.V.R., Bedford, M.R., Walk, C.L., 2019. Phytase as an alleviator of high-temperature stress in broilers fed adequate and low dietary calcium. *Poult. Sci.* 98, 2122–2132. <https://doi.org/10.3382/ps/pey566>.
- Li, M., Wu, J., Chen, Z., 2015. Effects of heat stress on the daily behavior of Wenchang chickens. *Braz. J. Poult. Sci.* 17, 559–566. <https://doi.org/10.1590/1516-635X1704559-566>.
- Manobhavan, M., Elangovan, A.V., Sridhar, M., Shet, D., Ajith, S., Pal, D.T., Gowda, N.K. S., 2016. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility, and bone characteristics in broilers fed corn-soya-based diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100, 93–100. <https://doi.org/10.1111/jpn.12341>.
- Martínez-Vallejo, B., Männer, K., Ader, P., Zentek, J., 2022. Evaluation of high doses of phytase in a low-phosphorus diet in comparison to a phytate-free diet on performance, apparent ileal digestibility of nutrients, bone mineralization, intestinal morphology, and immune traits in 21-day-old broiler chickens. *Anim. (Basel)* 12, 1955. <https://doi.org/10.3390/ani12151955>.
- Moraes, L.R., Delicato, M.E.A., Cruz, A.S., Silva, H.T.F.N.P., Alves, C.V.B.V., Campos, D. B., Saraiva, E.P., Costa, F.G.P., Guerra, R.R., 2021. Methionine supplementing effects on intestine, liver, and uterus morphology, and on positivity and expression of Calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. *PLoS ONE* 16, e0245615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245615>.
- Persia, M.E., Utterback, P.L., Biggs, P.E., Koelbeck, K.W., Parsons, C.M., 2003. Interrelationship between environmental temperature and dietary nonphytate phosphorus in laying hens. *Poult. Sci.* 82, 1763–1768. <https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1763>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acid. Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pieniazek, J., Smith, K.A., Williams, M.P., Manangi, M.K., Vazquezan, M., Solbak, A., Miller, M., Lee, J.T., 2017. Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. *Poult. Sci.* 96, 370–382. <https://doi.org/10.3382/ps/pez225>.
- Pirgözliev, V., Bedford, M.R., Acamovic, T., Mares, P., Allmeyer, M., 2011. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. *Brit. Poult. Sci.* 52, 245–254. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.560596>.
- Porto, M.L., Teófilo, T.S., Cavalcanti, D.M.L.P., Freitas, C.I.A., Oliveira, M.F., Fontenele-Neto, J.D., 2021. Incubation variables, performance, and morphometry of the duodenal mucosa of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) submitted to different incubation temperatures and thermally challenged after hatching. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 73, 495–507. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12052>.

- R Core Team, 2022. R: a Language and Environment for Statistical Computing (Version 4.2.0). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>.
- Rezende, M.S., 2017. Perfil bioquímico sanguíneo de linhagem pesada de frango de corte. Thesis (Doctor in Veterinary Sciences) Graduate Program in Veterinary Sciences of the Faculty of Veterinary Medicine. Federal University of Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais – Brazil, p. 63. Available at: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/21136/1/PerfilBioqu%C3%ADmicoSangu%C3%ADneo.pdf>.
- Ribeiro, A.G., Silva, R.S., Costa, F.S., Silva, E.G., Santos Ribeiro, J.E., Saraiva, E.P., Costa, F.G.P., Guerra, R.R., 2024. Phytase super-dosing modulates bone parameters and the concentration of the calcium epithelial carrier calbindin-D28k in quails (*Coturnix coturnix japonica*) under thermal stress. *Anim. Prod. Sci.* 64, AN24057. <https://doi.org/10.1071/AN24057>.
- Rojas, I.Y.M., González, E.A., Menocal, J.A., Santos, T.T., Arguello, J.R., Coello, C.L., 2017. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum-soybean-meal-based diets. *J. Appl. Anim. Res.* 46, 314–321. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1299740>.
- Rostagno, M.H., 2020. Effects of heat stress on the gut health of poultry. *J. Anim. Sci.* 98. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa090>.
- 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., de Oliveira, R.F., de Toledo Barreto, S.L., Brito, C.O., 2017. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais, 4th edn. UFV, Viçosa, Brazil. 488p Available at: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4532766/mod_resource/content/1/Rostagno%20et%20al%202017.pdf. [Portuguese].
- Santos, T.C., Gates, R.S., Tinôco, I.F.F., Zolnier, S., Rocha, K.S.O., Freitas, L.C.S.R., 2019. Productive performance and surface temperatures of Japanese quail exposed to different environmental conditions at the start of lay. *Poult. Sci.* 98, 2830–2839. <https://doi.org/10.3382/ps/pez068>.
- Scholtz, N., Halle, I., Flachowsky, G., Sauerwein, H., 2009. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. *Poult. Sci.* 88, 1186–1190. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00546>.
- Sena, T.L., Leite, S.C.B., Vasconcelos, A.M., Bezerra, M.M.R., Abreu, C.G., Farias, M.R.S., Silveira, R.M.F., 2020. Does dietary supplementation with phytases affect the thermoregulatory and behavioral responses of pullets in a tropical environment? *J. Therm. Biol.* 88, 102499. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102499>.
- Sharma, N.K., Choct, M., Wu, S.B., Smillie, R., Morgan, N., Omar, A.S., Sharma, N., Swick, R.A., 2016. Performance, litter quality and gaseous odour emissions of broilers fed phytase supplemented diets. *Anim. Nutr.* 2, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.10.003>.
- Silva, V.C., Nascimento, R.S., Lopes Neto, J.P., Riberio Miranda, J., de Melo Lopes, F.F., Furtado, D.A., 2022. Bioclimatic zoning for quails in the dry period in the state of Paraíba. *Brazil. Rev. Ceres* 69, 125–130. <https://doi.org/10.1590/0034-737x202269020001>.
- Sinclair-Black, M., Garcia-Mejia, R.A., Blair, L.R., Angel, R., Arbe, X., Cavero, D., Ellestad, L.E., 2024. Circadian regulation of calcium and phosphorus homeostasis during the oviposition cycle in laying hens. *Poult. Sci.* 103, 103209. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103209>.
- Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D.B., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G., 2004. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, p. 618 p.
- Truong, L., Miller, M.R., Sainz, R.D., King, A.J., 2023. Changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) blood gases and electrolytes in response to multigenerational heat stress. *PLoS Clim* 2, e0000144. <https://doi.org/10.1371/journal.pclm.0000144>.
- Usayran, N., Farran, M.T., Awadallah, H.H., Al-Hawi, I.R., Asmar, R.J., Ashkarian, V.M., 2001. Effects of added dietary fat and phosphorus on the performance and egg quality of laying hens subjected to a constant high environmental temperature. *Poult. Sci.* 80, 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1695>.
- Wang, X., Li, P., Zhao, J., Jiao, H., Lin, H., 2022. The temporal gene expression profiles of calcium and phosphorus transporters in Hy-Line Brown layers. *Poult. Sci.* 101, 101736. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101736>.
- Wasserman, R.H., Taylor, A.N., 1966. Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 152, 791–793. <https://doi.org/10.1126/science.152.3723.791>.
- Wolfenson, D., Sklan, D., Graber, Y., Kedar, O., Bengal, I., Hurwitz, S., 1987. Absorption of protein, fatty acids and minerals in young turkeys under heat and cold stress. *Brit. Poult. Sci.* 28, 739–742. <https://doi.org/10.1080/00071668708417010>.
- 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, 129–136. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210019>.
- Yan, F.F., Mohammed, A.A., Murugesan, G.R., Cheng, H.W., 2019. Effects of a dietary synbiotic inclusion on bone health in broilers subjected to cyclic heat stress episodes. *Poult. Sci.* 98, 1083–1089. <https://doi.org/10.3382/ps/pey508>.
- Zhang, H., Majdiddin, M., Gaublomme, D., Taminiau, B., Boone, M., Elewaut, D., Daube, G., Josipovic, I., Zhang, K., Michiels, J., 2021. 25-hydroxycholecalciferol reverses heat-induced alterations in bone quality in finisher broilers associated with effects on intestinal integrity and inflammation. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 12, 104. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00627-6>.
- Zhang, Y.N., Wang, S., Li, K.C., Ruan, D., Chen, W., Xia, W.G., Wang, S.L., Abouelezz, K. F.M., Zheng, C.T., 2020. Estimation of dietary zinc requirement for laying duck breeders: effects on productive and reproductive performance, egg quality, tibial characteristics, plasma biochemical and antioxidant indices, and zinc deposition. *Poult. Sci.* 99, 454–462. <https://doi.org/10.3382/ps/pez530>.