

SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *ADA*, *AVBD2* E *ANGPTL7* NA CARTILAGEM DE FRANGOS DE CORTE AFETADOS COM NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR AOS 21 DIAS DE IDADE

Débora Ester Petry Marcelino¹, Ágata Vendruscolo², Carlos Eduardo Santos³, Adriana Mércia Guaratini Ibelli^{4,5}, Jane de Oliveira Peixoto⁶ e Mônica Corrêa Ledur⁶

¹Graduanda em Engenharia Agrônoma pela FACC-Faculdade Concórdia, Campus Concórdia, bolsista CNPq/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, deboraester.agro@gmail.com

²Graduanda de Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia

³Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Unicentro, Guarapuava

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves

⁵Professor na Universidade do Contestado, Campus Concórdia

⁶Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: qPCR, expressão diferencial, BCO.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil ocupa o primeiro lugar na exportação e terceiro lugar na produção a nível mundial da carne de frango (1). Isto se deve a estudos que levaram a obtenção de aves com um maior potencial genético, de rápido crescimento e desenvolvimento, como também a nutrição, sanidade e manejos, o que favoreceu a alta eficiência em produção de carne destes animais. Contudo, também aumentou a incidência de problemas locomotores, pois o tecido ósseo não tem acompanhado estes processos fisiológicos (2). A necrose da cabeça do fêmur (NCF), também conhecida como Condronecrose bacteriana com osteomielite (BCO), é o problema locomotor mais comum em frangos de corte comerciais. A NCF afeta a região proximal do fêmur, causando a degeneração da epífise femoral, ocasionando grandes perdas econômicas mundiais pela queda no desempenho destes animais (3). A etiologia desta condição ainda é pouco conhecida, mas muitos fatores associados são de origem nutricional, ambiental e principalmente genética (4). Um dos genes expressos no tecido cartilaginoso femoral é o gene *ADA*, responsável por codificar uma proteína presente em células do sistema imunológico (5). Outros genes expressos neste tecido são *AVBD2*, *ANGPTL7*, *FBN2* e *OPG*. O gene *AVBD2* conhecido como beta defensina aviária 2, também é um componente do sistema imunológico e apresenta um efeito anti-bacteriano (6). O *ANGPTL7* codifica uma proteína anti-angiogênica (7). O fibrilina 2 (*FBN2*) desempenha uma função estrutural fornecendo substratos para a adesão celular, sendo componentes amplamente distribuídos nas matrizes extracelulares na formação de elastina (8). Já o *OPG*, membro da superfamília de receptor de TNF11B, possui interação com o ativador do receptor ligante do fator nuclear kappa B (RANKL) e desempenha papel dominante na osteoclastogênese. (9). A maioria dos estudos com NCF são realizados com tecido ósseo, contudo o tecido cartilaginoso femoral é de grande importância para integridade do sistema locomotor. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos genes candidatos *ADA*, *AVBD2*, *ANGPTL7*, *FBN2* e *OPG* em amostras do tecido cartilaginoso femoral de frangos de corte normais e afetados com necrose da cabeça do fêmur aos 21 dias de idade.

MATERIAL E METODOS

Foram utilizados 16 frangos de corte de uma linhagem comercial com 21 dias de idade, sendo 8 normais e 8 afetados com necrose de cabeça do fêmur. As amostras foram colhidas da cartilagem femoral e submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguido de purificação em coluna de sílica (Qiagen), conforme recomendações dos fabricantes. A concentração do RNA foi obtida através do equipamento de espectrofotômetro (BioDrop) e em gel de Agarose (1%) para avaliação da integridade. Posteriormente foi realizada a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Após, as amostras foram submetidas à técnica de PCR quantitativa (qPCR), realizada com o equipamento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems), com reações contendo: Master Mix na concentração 1X (GoTaq[®] qPCR Master Mix 2x, Promega), 0,16 µM de cada *primer F e R*, 2 µL de cDNA na diluição 1:10 e água ultrapura para completar 15 µL de reação total. As reações de qPCR foram feitas em duplicatas e os valores de Ct (*cycle threshold*) foram obtidos e transformados em $2^{-\Delta Ct}$. Como normalizadores foram utilizados os genes *RPL5* e *RPLP1*. A análise da expressão diferencial foi realizada utilizando-se a estatística *Mann-Whitney* no programa GraphPad (Prism8), sendo considerado o nível de significância $p < 0,1$ como significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes *ADA*, *AVBD2*, *ANGPTL7*, *FBN2* e *OPG* apresentaram amplificação nas amostras teciduais de cartilagem femoral. Os genes *ADA*, *AVBD2* e *ANGPTL7* foram diferencialmente expressos (DE) entre animais normais e afetados com NCF ($p < 0,1$), avaliados aos 21 dias de idade (Figura 1). O gene *ADA* codifica a enzima adenosina desaminase que está presente em todas as células, mas em maiores níveis nas células do sistema imunológico (5). Além disso, a adenosina protege células hospedeiras de alguma lesão excessiva no tecido devido a uma forte inflamação, o que nos indica que a expressão diferencial deste gene pode estar correlacionada com a resposta imune da patologia locomotora (10). O gene *AVBD2*, conhecido como beta defensina aviária 2, é considerado componente do sistema imunológico inato em

animais. Estes peptídeos antimicrobianos são bem distribuídos em muitos tecidos, incluindo a medula óssea, baço, fígado e testículos. Seus níveis de expressão de mRNA podem ter diferentes funções biológicas, além de seu conhecido efeito anti-bacteriano (6). A diferença na expressão deste gene pode indicar uma possível infecção bacteriana, que já tem sido descrita como uma das causas da BCO. O gene *ANGPTL7*, conhecido como *Aniopoietin-like 7*, codifica uma proteína anti-angiogênica e em camundongos é encontrado em células embrionárias, fibroblastos, células do timo, testículos e células sinoviais (7). A superexpressão deste gene nos animais afetados pode estar levando a falta de vascularização do tecido. Os genes fibrilina 2 (*FBN2*) e osteoprotegerina (*OPG*) não foram DE na cartilagem das aves de corte afetadas com NCF.

CONCLUSÕES

A superexpressão dos genes *ADA*, *AVBD2* e *ANGPTL7* em aves afetadas com NCF indica que esses genes relacionados à vascularização, inflamação e resposta inata da cartilagem podem estar envolvidos no desenvolvimento dessa desordem em frangos de corte.

REFERÊNCIAS

1. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL.** Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal. ABPA, 2020. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf> Acesso em:31/08/20
2. BERNARDI, R. **Problemas Locomotores em frangos de corte.** Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados- MS, 2011.
3. WIDEMAN; PRISBY, Rhonda D. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis. **Frontiers In Endocrinology**, p.3-183, 2013.
4. OLKOWSKI, A. A; LAARVELD, B; WOJNAROWICZ, C; CHIRINO-TREJO, M; CHAPMAN, D; WYSOKINSKI, T. W; QUARONI, L. Biochemical and physiological weaknesses associated with the pathogenesis of femoral bone degeneration in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 40, n. 6, p. 639-650, 2011.
5. **GENETICS HOME REFERENCE.** Gene ADA. Your Guide to Understanding Genetic Conditions. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ADA>> Acesso em: 01/09/20
6. LU, S., PENG, K., GAO, Q., XIANG, M., LIU, H., SONG, H. XIAO, K. Molecular cloning, characterization and tissue distribution of two ostrich β -defensins: AvBD2 and AvBD7. **Gene**, 2014
7. KATOH, Y.; KATOH, M. Comparative integromics on angiopoietin Family members. **International Journal of Molecular Medicine**. Atenas, Grécia. v. 17. p. 1145-1149, 2006.
8. BURKE, R. D., WANG, D., MARK, S., & MARTENS, G. Distribution of fibrillin I in extracellular matrix and epithelia during early development of avian embryos. **Anatomy and Embryology**, 2000
9. LIU, R., JIN, C., WANG, Z., WANG, Z., WANG, J., & WANG, L. Effects of manganese deficiency on the microstructure of proximal tibia and OPG/RANKL gene expression in chicks. **Veterinary Research Communications**, 39(1), 31–37, 2015.
10. BOIAGO, M. M., BALDISSERA, M. D., DOLESKI, P. H., BOTTARI, N. B., DO CARMO, G. M., ARAUJO, D. N., DA SILVA, A. S. Ectonucleotidases and adenosine deaminase activity in laying hens naturally infected by *Salmonella Gallinarum* and. **Microbial Pathogenesis**, 2016.

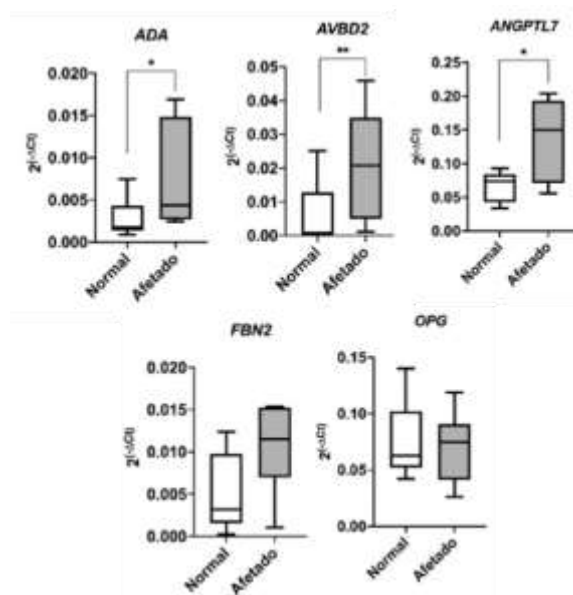


Figura 1. Expressão dos genes *ADA*, *AVBD2*, *ANGPTL7*, *FBN2* e *OPG* no tecido cartilaginoso femoral entre frangos de corte normais e afetados com NCF aos 21 dias de idade. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,1$.