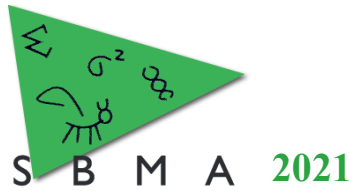


XIV Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

18 a 19 de Outubro de 2021

On-line





Comparação de transcriptomas evidencia vias de diferenciação de condrócitos e desenvolvimento da cartilagem envolvidas na manifestação da necrose da cabeça do fêmur em frangos de corte

Lana Teixeira Fernandes¹, Iara Goldoni², Ludmila Mudri Hul², Adriana Mércia Guaratini Ibelli^{1,2}, Jane de Oliveira Peixoto^{1,2}, Maurício Egídio Cantão¹, Mônica Corrêa Ledur^{1,3}

¹Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Guarapuava, PR, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UDESC-Oeste, Chapecó, SC, Brasil.

*Autor correspondente: lanatf@yahoo.fr

Resumo: A necrose de cabeça do fêmur (NCF) é um dos principais problemas locomotores que afetam a produção avícola. No entanto, sua etiologia e mecanismos moleculares envolvidos em sua ocorrência permanecem em grande parte desconhecidos. Portanto, objetivou-se identificar genes diferencialmente expressos e exclusivos da cartilagem articular e da placa de crescimento do fêmur de frangos de 35 dias de vida acometidos por NCF e animais normais, além de se identificar processos biológicos relacionados à ocorrência dessa alteração. Os resultados obtidos contribuem para melhor compreensão do papel de genes e eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento da NCF.

Palavras-chave: crescimento rápido, expressão gênica, galinha, necrose da cabeça do fêmur, RNA-seq.

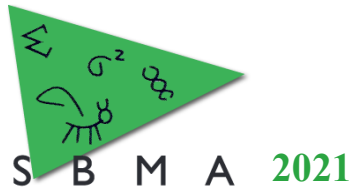
Comparison of transcriptomes highlights chondrocyte differentiation and cartilage development pathways involved in broilers femoral head necrosis

Abstract: The Femoral Head Necrosis (FHN) is one of the main locomotor problems that affect the poultry production. However, the etiology and molecular mechanisms involved in its development remains largely unknown. Therefore, the objective of this study was to identify differentially expressed genes and biological processes exclusively in the articular cartilage and in the grow plate of femur from 35-days-old broilers suffering from FHN and their healthy counterparts. These findings contribute to a better understanding on the role of genes and molecular events involved in FHN triggering and development.

Keywords: fast-growing, chicken, femoral head necrosis, gene expression, RNA-seq

Introdução

Os problemas de integridade óssea em frangos têm sido relacionados à seleção para crescimento rápido, causando grandes perdas econômicas ao setor avícola mundial, pela diminuição do desempenho das aves, além de comprometer o bem-estar animal. Dentre os distúrbios locomotores mais importantes em frangos de corte está a necrose de cabeça de fêmur (NCF), também conhecida como condronecrose bacteriana com osteomielite (BCO). Este problema inicia-se com a degeneração da cartilagem articular e da placa de crescimento da região proximal da cabeça do fêmur levando à separação da cartilagem da cabeça do fêmur (Packislaksmi et al., 2015). Apesar da relevância desse distúrbio e dos estudos conduzidos até o momento, aspectos relacionados a sua etiologia e mecanismos genéticos ainda não estão completamente esclarecidos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar genes com expressão diferencial exclusiva na cartilagem articular e na placa de crescimento da cabeça do fêmur de frangos de corte normais afetados com NCF aos 35 dias de idade utilizando a técnica de sequenciamento de RNA. Esses resultados podem ajudar no esclarecimento e compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão da NCF nos tecidos ósseo e cartilaginoso na região proximal do fêmur que é sítio de grande pressão no crescimento dos frangos.



Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados vinte e nove frangos de corte machos (14 normais e 15 apresentando claudicação), da linhagem comercial Cobb 500 com 35 dias de idade e provenientes de uma granja localizada em Concórdia (SC). Os animais selecionados foram enviados a Embrapa Suínos e Aves para necropsia e colheita de amostras. Após avaliação macroscópica e classificação do escore da necrose da cabeça do fêmur (NCF), os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle foi composto por animais que apresentavam boa adesão entre a placa de crescimento (GP) da cabeça proximal do fêmur e a cartilagem articular (AC) e o grupo afetado por NCF consistiu-se em frangos apresentando separação entre a placa de crescimento e a cartilagem articular. Em seguida, amostras de GP e AC femoral foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para posterior utilização. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Embrapa Suínos e Aves com o protocolo 012/2012. A extração do RNA total das placas de crescimento e cartilagem articular foi efetuada utilizando-se Trizol Reagent (Invitrogen) e RNeasy mini kit (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. Um total de 16 amostras (4 AC normais, 4 AC afetados, 4 GP normais e 4 GP afetados) foi utilizado para construção das bibliotecas de RNA que foram preparadas com o kit TruSeq RNA Sample Prep v2 (Illumina) para amostras de PC e o kit TruSeq Total Stranded Sample Preparation (Illumina) para amostras de AC. Para a análise de RNAseq, as bibliotecas de cDNA foram sequenciadas em equipamento Illumina[®] HiSeq 2500 utilizando-se o protocolo paired-end (2x100pb) com amostras de cada tecido em uma *lane* diferente. Para o processo de controle de qualidade, a ferramenta Trimmomatic foi aplicada. Para a etapa de mapeamento, as seqüências foram alinhadas contra o genoma de referência da galinha (GRCg6a) disponível na página do Ensembl (www.ensembl.org), através do programa STAR. O pacote EdgeR foi usado para identificar os genes diferencialmente expressos (DE) entre o grupo afetado com NCF e o controle para cada tecido. Genes com *false discovery rate* (FDR) $< 0,05$ foram considerados DE, após aplicação do método de correção de Benjamini-Hochberg. Os genes foram considerados mais ou menos expressos de acordo com os valores de \log_2 *fold-change* (LogFC). A base de dados Biomart (<https://www.ensembl.org/biomart>) foi usada para anotar os genes DE. A base de dados David 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) foi utilizada para as análises de ontologia dos genes DE. As análises de enriquecimento foram realizadas a partir da informação do genoma da galinha presente nessas bases de dados e o programa STRING (<https://string-db.org/>) foi usado para a criação da rede gênica.

Resultados e Discussão

Através da análise do transcriptoma da AC foram identificados 12,182 genes expressos nesse tecido, dos quais 106 foram DE: 99 genes mais e 7 genes menos expressos no grupo de frangos afetados por NCF comparado ao grupo normal. Analisando o transcriptoma da GP, um total de 12.632 genes foram expressos, e 324 genes foram DE entre o grupo afetado e o grupo normal. Destes, 174 genes foram mais expressos e 150 menos expressos no grupo afetado. Foram identificados 36 genes (DE) compartilhados entre AC e GP que foram excluídos das análises subsequentes. De acordo com a categoria de ontologia gênica de processos biológicos dos genes DE da GP, destacam-se os processos relacionados à diferenciação de condrócitos e desenvolvimento da cartilagem, agrupando 3 genes principais que apresentaram menor expressão no grupo afetado: *CHADL*, *GDF5* e *PTHLH*. O gene *CHADL* é expresso em tecidos cartilaginosos, influencia a fibrilogênese de colágeno e modula negativamente a diferenciação de condrócitos (Tillgren et al., 2015). Em humanos, o aumento da expressão do gene *GDF5* está relacionado ao remodelamento dos tecidos da articulação. Após lesão da articulação observou-se sua alta expressão em condrócitos, tanto no novo tecido de reparação da cartilagem como na cartilagem adjacente danificada (Kania et al., 2020). O gene *PTHLH* promove a proliferação de condrócitos e inibe sua hipertrofia e diferenciação terminal. Em pacientes com osteoartrite, esse gene se encontra altamente expresso em condrócitos e líquido sinovial (Duan et al., 2020). Entre os processos biológicos (PB) da AC, a resposta contra bactérias pode ser destacada, sendo que todos os genes envolvidos nesse PB foram mais expressos no grupo com NCF (Figura 1). Dentre eles destacam-se a cathelicidin-2 (*CAMP*) e cathelicidin-3 (*CATH3*) que possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana e a habilidade de limitar a inflamação inibindo a ativação do *Toll-like receptor 2* (*TLR2*) e *TLR4* (Coorens et al., 2017). Esses resultados sugerem, por um lado, que a placa de crescimento não é totalmente eficiente no processo de reparação e remodelação da

cartilagem danificada. Por outro lado, a cartilagem articular é capaz de controlar em parte a infecção bacteriana e a intensidade da inflamação que podem intensificar a lesão tecidual.

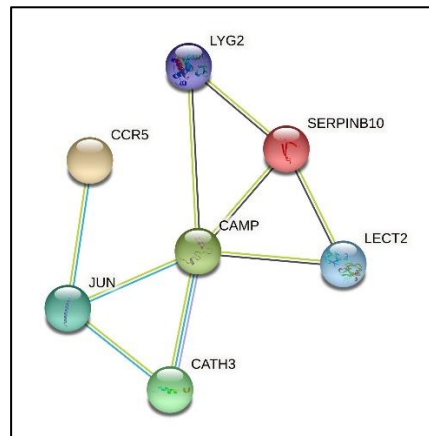


Figura 1. Análise de redes gênicas realizadas no Stringdb. Principais genes DE da cartilagem articular relacionados à defesa contra bactérias. Linhas de cores diferentes indicam o tipo de evidência descrita: amarelo: *text mining*, preto: coexpressão; roxo: homologia de proteínas e azul claro: informações obtidas de bases de dados curadas.

Conclusão

Os resultados obtidos avançam no conhecimento sobre o desenvolvimento da NCF e dos papéis que esses grupos de genes têm na evolução desse distúrbio. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para entender o processo das infecções bacterianas e seu papel no agravamento das lesões.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo projeto nº 01.11.07.002.03 da EMBRAPA. LTR é bolsista especialista visitante (EV-1) do CNPq na Embrapa Suínos e Aves. MCL é bolsista de produtividade de pesquisa do CNPq. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES, Código de Financiamento 001.

Literatura citada

- Coorens, M., Banaschewski, B.J.H., Baer, B.J., Yamashita, C., van Dijk A., Haagsman, H.P., Veldhuizen, R.A.W. & Veldhuizen, E.J.A. 2017. Killing of *Pseudomonas aeruginosa* by Chicken Cathelicidin-2 Is Immunogenically Silent, Preventing Lung Inflammation *In Vivo*. **Infect Immun**, 17, 85.
- Duan, Z.X., Li, Y.S., Tu, C., Xie, P., Li, Y., Qi, L. & Li, Z. 2020. Identification of a potential gene target for osteoarthritis based on bioinformatics analyses. **J Orthop Surg Res**, 15(1), 228.
- Kania, K., Colella, F., Riemen, A.H.K., Wang, H., Howard, K.A., Aigner, T., Dell'Accio, F., Capellini, T.D., Roelofs, A.J. & Bari, C.D. 2020. Regulation of Gdf5 expression in joint remodelling, repair and osteoarthritis. **Scientific Reports**. 10, 157.
- Packialakshmi, B., Rath, N.C., Huff, W.E. & Huff, G.R. 2015. Poultry Femoral Head Separation and Necrosis: a review. **Avian Diseases**, 59, 349-354
- Tillgren, V., Ho, J.C., Önerfjord, P. & Kalamajski, S. 2015. The novel small leucine-rich protein chondroadherin-like (CHADL) is expressed in cartilage and modulates chondrocyte differentiation. **J Biol Chem**. 290, 918-925.