

Fatores relacionados à variação na expressão gênica no fêmur de frangos de corte

Rafael Keith Ono¹, Ediane Paludo², Adriana Mércia Guaratini Ibelli¹; Jane de Oliveira Peixoto¹, Bruna Petry³, José Rodrigo Cláudio Pandolfi¹, Letícia Lopes¹, Fátima Regina Ferreira Jaenisch¹, Mônica Corrêa Ledur^{1*}

¹Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

²Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Ciência Animal, Lages, SC, Brasil

³Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Chapecó, SC, Brasil

*Autor correspondente: monica.ledur@embrapa.br

Resumo: Ao longo dos últimos anos, os animais têm sido selecionados para maior peso e rápido crescimento, o que acarretou um aumento na incidência de problemas locomotores em frangos de corte. Estes são considerados atualmente um dos principais problemas na produção de aves no mundo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de 3 genes relacionados com integridade óssea no fêmur de duas linhas de corte da Embrapa Suínos e Aves: uma selecionada (TT) e outra controle, sem seleção (LLc), em duas idades distintas: 21 e 42 dias. Para cada linha foram coletadas 24 aves (12 fêmeas e 12 machos) em cada idade estudada. Para a quantificação relativa foram escolhidos 3 genes candidatos: *BMP2*, *RUNX2* e *SPARC*. A análise de variância incluiu os efeitos fixos de linha, sexo, idade e suas interações. As interações (Idade x Linha) para *RUNX2* e *SPARC* e (Idade x Sexo) para *BMP2* foram significativas ($p < 0,05$). Aos 21 dias de idade, os níveis de expressão do *RUNX2* e *SPARC* foram maiores na linha TT do que na LLc, possivelmente devido ao processo de seleção realizado na linha TT. Aos 42 dias de idade, os machos apresentaram maiores níveis de expressão do gene *BMP2* do que as fêmeas de ambas as linhas, o que pode ser devido ao aumento gradativo da produção de testosterona até a ave atingir a maturidade sexual.

Palavras-chave: *BMP2*, osso, qPCR, *RUNX2*, *SPARC*

Factors related to the variation on gene expression in the femur of broilers

Abstract: In the last years, heavier and fast-growing chickens have been selected, which has led to an increase in the broilers locomotor problems. These are currently considered one of the main issues in the poultry production worldwide. Thus, the objective of this study was to evaluate the expression of 3 genes related to bone integrity in the femur of two broiler lines from Embrapa Suínos e Aves: one selected (TT) and one control, with no selection (LLc), at two different ages: 21 and 42 days. For each line, 24 broilers (12 females and 12 males) were collected in each age studied. For the relative quantification, 3 candidate genes were chosen: *BMP2*, *RUNX2* and *SPARC*. The analysis of variance included the fixed effects of line, sex, age and their interactions. The interactions (Age x Line) for *RUNX2* and *SPARC* and (Age x Sex) for *BMP2* were significant ($p < 0.05$). At 21 days of age, the expression levels of *RUNX2* and *SPARC* were higher in the TT line than in the LLc, possibly due to the selection applied to TT. At 42 days of age, males had higher levels of *BMP2* gene expression than females in both lines, which may be due to the gradual increase in testosterone production until the chickens sexual maturity is reached.

Keywords: *BMP2*, bone, qPCR, *RUNX2*, *SPARC*

Introdução

Por meio de intenso melhoramento genético, as empresas de genética avícola têm produzido linhagens cada vez mais precoces e com maior desenvolvimento muscular. Ao longo das gerações de seleção, o desenvolvimento do tecido ósseo não acompanhou os processos fisiológicos dos demais tecidos corpóreos, acarretando aumento de problemas locomotores em frangos. Esses problemas nas granjas comerciais continuam sendo uma preocupação para a indústria avícola brasileira (ALVES et al., 2016), principalmente, devido ao comprometimento do bem-estar animal e aos prejuízos e transtornos causados durante o transporte, abate e processamento da carne.

A elucidação das vias moleculares e dos genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento ósseo pode ajudar no incremento do melhoramento genético, no sentido de produzir animais com características ósseas mais desejáveis, mantendo-se a eficiência na produção. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de 3 genes relacionados com integridade óssea no fêmur de uma linhagem selecionada para produção de carne e outra linhagem controle em duas idades distintas.

Material e Métodos

Foram utilizadas aves de duas linhagens de corte da Embrapa Suínos e Aves, sendo a TT selecionada para múltiplas características e a LLc uma linhagem controle, mantida sem seleção ao longo dos anos. Foram utilizadas 24 aves de cada linhagem (12 fêmeas e 12 machos) nas idades de 21 e 42 dias. As aves foram criadas sob as mesmas condições nutricionais e de manejo, numa densidade de 10 aves/m², recebendo água e ração a vontade. A necropsia das aves foi realizada para coleta do fêmur esquerdo, que foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de expressão gênica.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de amostra da placa de crescimento do fêmur utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen) e quantificado em espectrofotômetro. Para a síntese de cDNA foram utilizados 3 µg de RNA total usando o kit *Super Script II First-Strand Synthesis SuperMix* (Life Technologies). Para a quantificação relativa foram escolhidos 3 genes candidatos: *BMP2* (proteína morfogenética óssea 2), *RUNX2* (fator de transcrição relacionada ao fator Runt 2) e *SPARC* (osteonectina), utilizando-se os *primers* e condições de ciclagem de acordo com o descrito por Paludo (2016). O ciclo limiar (Ct) médio foi obtido e o gene *HMBS* (Hidroximetilbilano Sintase) foi utilizado para normalização de cada amostra. A análise de variância foi realizada por meio do procedimento *MIXED* do SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC), testando-se os efeitos fixos de linhagem, sexo, idade e suas interações, considerando-se 5% de significância.

Resultados e Discussão

Nesse estudo buscou-se investigar a influência da seleção genética, do sexo e da idade sobre a expressão de genes relacionados à integridade óssea em duas linhagens de corte, uma selecionada para múltiplas características por 20 gerações e outra linhagem controle. Foram significativas ($p < 0,05$) as interações (Idade x Linhagem) para *RUNX2* e *SPARC* (Figura 1) e (Idade x Sexo) para *BMP2* (Figura 2). O desenvolvimento normal do osso depende do nível de expressão do gene *RUNX2*, que atua principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento como cofator dos osteoblastos na formação do osso (LIU & LEE, 2013). O gene *SPARC* atua na formação, desenvolvimento e remodelação do tecido ósseo e na montagem dos filamentos de colágeno. Sua expressão tem sido associada à resistência óssea, permitindo a calcificação da matriz extracelular do osso (PARVANEH et al., 2015). Aos 21 dias de idade, os níveis de expressão do *RUNX2* e *SPARC* foram maiores na linhagem TT do que na LLc (Figura 1). Possivelmente, a seleção realizada na linhagem TT tenha influenciado a expressão desses genes, que são importantes para o desenvolvimento e maturação do tecido ósseo.

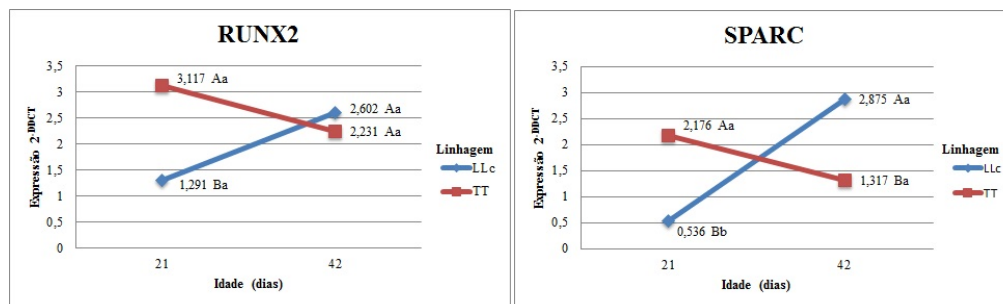


Figura 1. Expressão dos genes *RUNX2* e *SPARC* nas Linhagens TT e LLc nas idades de 21 e 42 dias. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença dentro de idade e letras minúsculas diferentes indicam diferença dentro de linhagem ($p < 0,05$).

Aos 42 dias de idade, os machos apresentaram maiores níveis de expressão do gene *BMP2* do que as fêmeas de ambas as linhagens, evidenciando interação significativa entre idade e sexo (Figura 2). Esta interação pode ser explicada pela influência direta de hormônios sexuais sobre o gene em estudo, já que desempenham ampla ação sobre o desenvolvimento e maturação do esqueleto, tanto em fêmeas quanto em machos (KHOSLA, 2010). Em camundongos, a testosterona media seus efeitos através do receptor de andrógeno que funciona como um fator de transcrição controlando um programa integrado de expressão gênica, necessário para a formação óssea e mineralização (KANG et al., 2008). Dessa forma, a maior expressão do *BMP2* aos 42 dias nos machos em relação às fêmeas pode ser devido ao aumento gradativo da produção de testosterona até a ave atingir a maturidade sexual.

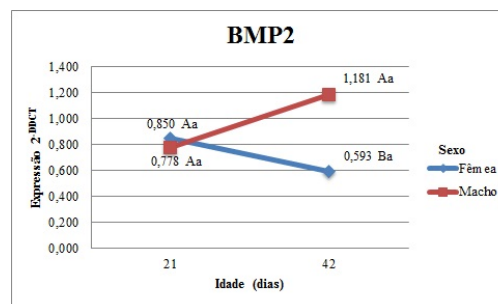


Figura 2. Expressão do gene *BMP2* em machos e fêmeas nas idades de 21 e 42 dias. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença dentro de idade e letras minúsculas diferentes indicam diferença dentro de sexo ($p < 0,05$).

Conclusão

Este estudo permitiu melhorar o entendimento sobre os efeitos de fatores como idade, sexo e seleção sobre a variação da expressão de importantes genes candidatos relacionados à integridade óssea em frangos de corte.

Agradecimentos

Este projeto foi financiado pela Embrapa. Os autores agradecem Alexandre L. Tessmann pela assistência técnica e a concessão das bolsas de estudos de RKO pelo ICASA, de EP pela CAPES e de BP pela PROMOP/Udesc.

Literatura citada

- ALVES, M. C. F.; PAZ, I. C. L. A.; NÄÄS, I. A.; GARCIA, R. G.; CALDARA, F. R.; BALDO, G. A. A.; GARCIA, E. A.; MOLINO, A. B. Locomotion of commercial broilers and indigenous chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 45, n. 7, p. 372-379, 2016.
- LIU, T. M.; LEE, E. H. Transcriptional regulatory cascades in *RUNX2*-dependent bone development. **Tissue Engineering**, v. 19, n. 3, p. 254-63, 2013.
- PALUDO, E.; IBELLI, A. M. G.; PEIXOTO, J. O.; TAVERNARI, F. C.; LIMA-ROSA, C. A. V.; PANDOLFI, J. R. C., LEDUR, M. C. The involvement of *RUNX2* and *SPARC* genes in the bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers. **Animal**, p. 1-8. 2016.
- PARVANEH, K.; EBRAHIMI, M.; SABRAN, M. R.; KARIMI, G.; HWEI, A. N. M.; ABDULMAJEED, S.; AHMAD, Z.; IBRAHIM, Z.; JAMALUDDIN, R. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate *SPARC* and *Bmp-2* Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- KANG, H. Y.; SHYR, C. R.; HUANG, C. K.; TSAI, M. Y.; ORIMO, H.; LIN, P. C.; CHANG, C.; HUANG, K. E. Altered TNSALP expression and phosphate regulation contribute to reduced mineralization in mice lacking androgen receptor. **Molecular Cellular Biology**, v. 28, p. 7354-7367, 2008.
- KHOSLA, S. Update on estrogens and the skeleton. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 3569-3577, 2010.