

GENES *Col16A1* e *ANGPT4* SÃO MENOS EXPRESSOS EM SUÍNOS AFETADOS COM OSTEOCONDROSE *LATENS*

Raira da Costa Kowacic¹, Adriana Mércia Guaratini Ibelli², Jane de Oliveira Peixoto³, Nelson Morés³, Marcos Antonio Zanella Morés³, Maurício Egídio Cantão³, Igor Ricardo Savoldi^{1,4}, Kamilla Bleil do Carmo^{1,4}, Luiz Lehman Coutinho⁵, Mônica Corrêa Ledur³

¹Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, raira_22@hotmail.com

²Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia

³Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

⁴Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC

⁵Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil

Palavras-chave: qPCR, expressão gênica, MS115.

INTRODUÇÃO

Os problemas locomotores estão entre os principais fatores que resultam em perdas econômicas para a suinocultura industrial (1,2). Entre os principais prejuízos, está a diminuição da produtividade (3) e a preocupação com bem-estar animal, já que esses animais sentem dor e muitas vezes não conseguem ter acesso à água e alimentação. Ademais, nas últimas décadas, houve um aumento na condenação de carcaças em abatedouros devido às artrites, sendo que se for considerada apenas as assépticas, a osteocondrose é a mais frequente (4). Diferenças encontradas na prevalência dessa desordem entre diferentes raças e linhagens de suínos indicam fortemente que há um componente genético envolvido na ocorrência de osteocondrose (5). No Brasil, as informações disponíveis sobre a prevalência e prejuízos causados pela osteocondrose são escassas, assim como os estudos de análise de expressão gênica tentando entender a etiologia desta condição (6). No entanto, sabe-se que grande parte das linhagens de suínos utilizadas no Brasil é proveniente de raças que apresentam susceptibilidade de desenvolver lesões de osteocondrose (6, 12). Dessa maneira, mais estudos são necessários visando entender os fatores envolvidos no aparecimento dessa doença. Neste sentido, objetivou-se neste trabalho avaliar a expressão dos genes *Col16A1* (colágeno 16 cadeia A1) e *ANGPT4* (angiopoietina 4) em marrãs MS115 normais e afetadas com osteocondrose *latens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho foram selecionadas 3 amostras de cartilagem articular do fêmur de marrãs normais e 3 amostras de marrãs afetadas com osteocondrose *latens*, provenientes da Embrapa Suínos e Aves, conforme descrito por (7). Estas foram submetidas a extração de RNA total utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, associada com purificação em coluna de sílica (Qiagen). A qualidade e quantidade do RNA total foram avaliadas em espectrofotômetro Biodrop e no Bioanalyzer Agilent 2100. As bibliotecas de RNA foram preparadas utilizando-se o kit *TruSeq Total Stranded Sample Preparation* (Illumina) e o sequenciamento *paired-end* (2x100 bp) foi realizado em equipamento HiSeq 2500 (Illumina) no Centro de Genômica Funcional da ESALQ-USP. As sequências foram submetidas ao controle de qualidade no software SeqyClean (<https://github.com/ibest/seqyclean>), mapeadas contra o genoma de referência do suíno (*Sus scrofa* v 11.1, Ensembl 90) no software STAR (8) e contagem das *reads* no pacote HT-Seq (www.huber.embl.de/HTSeq/). A análise de expressão gênica diferencial foi obtida utilizando-se o pacote EdgeR (<http://bioconductor.org/packages/edgeR/>) do Bioconductor no R. Uma vez obtidos os genes diferencialmente expressos (DE), a anotação funcional foi realizada utilizando-se a base de dados DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A osteocondrose, uma falha multifocal na ossificação endocondral, é uma das principais doenças que afetam os suínos comerciais (2,5). Estudos demonstraram que há um atraso na ossificação que pode ser causado pela presença de condronecrose, dificultando a reabsorção óssea (5). Sabe-se que a falta de vascularização leva a essa falha focal (9), no entanto, sua etiologia ainda é desconhecida (10). Neste trabalho, os genes *Col16A1* e *ANGPT4*, que apresentam função na formação de fibras de colágeno e manutenção da matriz extracelular e modulação da angiogênese (10, 11), apresentaram-se 1,27 e 1,5 vezes menos expressos no grupo afetado com osteocondrose *latens* em relação aos animais normais (Figura 1). Processos biológicos (PB) relacionados a regulação já foram descritos em estudos de ossificação endocondral e aparecimento da osteocondrose em suínos (7), sendo que os genes estudados desempenham funções que podem ser englobadas na maioria destes PB. Desta forma, a baixa expressão do gene *ANGPT4* pode estar envolvida na diminuição da capacidade da vascularização da cartilagem (11), enquanto o gene *Col16A1* pode afetar a formação da matriz da cartilagem. Recentemente, Finnoy et al. (10) relataram que os canais de cartilagem podem variar quanto a presença de diferentes tipos de colágeno e, dependendo dos tipos predominantes, pode facilitar o aparecimento de osteocondrose em suínos.

CONCLUSÕES

A menor expressão dos genes *Col16A1* e *ANGPT4* está envolvida na manifestação da osteocondrose *latens* em suínos.

REFERÊNCIAS

1. MORES, N. et al. Fatores de risco associados com artrites em suínos de abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 55, 133-140, 2003.
2. NAKANO, T.; BRENNAN, J.J.; AHERNE, F.X. Leg weakness and osteochondrosis in swine: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, 67, 883 – 901, 1987.
3. Jensen TB, Kristensen HH, Toft N. Quantifying the impact of lameness on welfare and profitability of finisher pigs using expert opinions. **Live Sci**. 2012;149:209–214.
4. Alberton, G.C.; Pereira, M.A.C.; Yamamoto, M.T. et al. Osteocondrose: principal causa de artrite em suínos de abatedouro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. *Anais ...* Concórdia: EMBRAPA – CNPSA, 1999. p.257-258.
5. Ytrehus B., Ekman S., Carlson C.S., Teige J., Reinholt F.P. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. **Bone**, 35, 1294-1306, 2004.
6. Ezequiel M.C., Faria A.C.S., Paula D.A.J., Pitchenin L.C., Brandão L.N.S., De Souza R.L., Nakazato L., Dutra V. Characterization of gene expression in pigs on condition of osteochondrosis. **Veterinary Science Research**, v. 3, 48-54, 2012.
7. Romano, G.S.; Ibelli, A.M.G.; Peixoto, J.O.; Morés, N.; Morés, M.A.Z.; Cantão, M.E.; Rech, R.R.; Savoldi, I.R.; Carmo, K.B.; Figueiredo, E.A.P.; Coutinho, L.L.; Ledur, M.C. Identificação de mecanismos genéticos envolvidos na osteocondrose *latens* em suínos. XII Simpósio de Melhoramento Animal, 2017. Disponível online: <http://sbmaonline.org.br/anais/xii/pdf/BHSHK.pdf>.
8. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, J.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, **Bioinformatics**, 29, 15–21, 2013.
9. Olstad K, Ekman S, Carlson CS. An update on the pathogenesis of Osteochondrosis. **Vet Pathol**. 2015;52:785–802.
10. Finnoy, A; Olstad K; Lilledahl, M. Non-linear optical microscopy of cartilage canals in the distal femur of young pigs may reveal the cause of articular osteochondrosis. **BMC Veterinary Research**, 13:270, 2017.
11. Andia, I.; Sanchez, M.; Maffulli, N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. **Expert Opin Biol Ther**. 12, 7-22, 2012.
12. ANDERSSON-EKLUND, L; UHLHORN, H; LUNDEHEIM, N; DALIN, G; ANDERSSON, L. Mapping quantitative trait loci for principal components of bone measurements and osteochondrosis scores in a wild boar 9 large white intercross. *Genet Res*, 75(2): 223–230, 2000

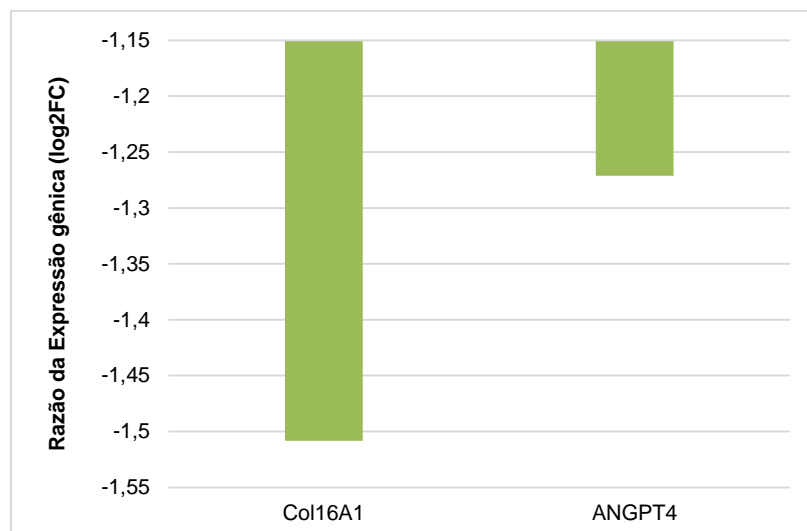


Figura 1. Razão de expressão dos genes *Col16A1* e *ANGPT4* provenientes dos transcriptomas obtidos a partir de cartilagem articular de marrãs MS115 normais e afetadas com osteocondrose *latens*.