

EXPRESSÃO DO GENE *PTHLH* EM FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS PELA NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR

Igor Ricardo Savoldi¹, Bruna Petry², Kamilla Bleil do Carmo¹, Adriana M. Guaratini Ibelli³, Jane de Oliveira Peixoto⁴, Mônica Corrêa Ledur⁴

¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC, igorsavoldi154@hotmail.com

²Mestranda em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina-UEDESC, Chapecó

³Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁴Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Palavras-chave: condronecrose bacteriana com osteomielite, hormônio da paratireoide, expressão gênica.

INTRODUÇÃO

A alta incidência de problemas locomotores que afetam as aves preocupa a agroindústria gerando perdas econômicas na produção e comprometendo o bem estar das aves. A Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF) também conhecida como Condronecrose bacteriana com osteomielite (BCO) é uma anomalia óssea que afeta a região proximal do fêmur, degenerando a epífise femoral que leva a perdas significativas na produção, sendo um dos principais problemas que acomete os frangos de corte (1). Geralmente esta anomalia está associada a diversos fatores como nutrição, manejo, sanidade e principalmente genética, apresentando herdabilidade moderada, indicando que há fatores genéticos influenciando no desenvolvimento deste problema (2). Entretanto, poucas pesquisas têm sido conduzidas visando elucidar a etiologia desta condição, com a finalidade de reduzir o impacto causado por esse problema ósseo. Em muitas espécies, o gene do hormônio semelhante ao Paratormônio (*PTHLH*) codifica uma proteína relacionada ao Hormônio paratireoide (*PTHrH*) que está envolvida na regulação do desenvolvimento ósseo, estando relacionada com cicatrização de fraturas. O *PTHLH* atua nas vias de transporte de íons de cálcio e nas interações entre células epiteliais e mesenquimatosas (3). Além disso, este gene está expresso durante a histogênese do tecido esquelético afetando a diferenciação de células mesenquimais mandibulares, condroblastos e osteoblastos (4). Porém, pouco se sabe sobre esta família de receptores e sua atuação sobre o sistema ósseo das galinhas. Neste contexto, no presente estudo buscou-se avaliar a expressão do gene relacionado ao Hormônio da Paratireoide (*PTHLH*) em frangos de corte normais e afetados pela Necrose da Cabeça do Fêmur.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas amostras da placa de crescimento do fêmur de 20 frangos de corte machos com 35 dias de idade, sendo 10 normais e 10 afetados pela NCF. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). Em seguida foi realizado o *clean-up* de RNA utilizando o mini kit RNeasy (Qiagen) seguindo recomendações do fabricante. A concentração foi avaliada em equipamento BioDrop e a integridade em gel de Agarose 1,5%. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit SuperScript® III First – Strand Synthesis SuperMix, seguindo recomendações do fabricante. Para a quantificação relativa da expressão do gene *PTHLH* foram utilizados iniciadores na junção exon-exon, sendo: *Primer F* 5'-CAGACGAAGTGCAGCAACA-3' e *Primer R* 5'-ATGCCGGGCAAAGTGGAGAC-3', desenhados pelo programa Primer-BLAST do NCBI. Como normalizadores foram utilizados os genes constitutivos RLP4 e RLP30. A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio 6 Flex System Software (Applied Biosystems), utilizando-se o *Master Mix SYBR Green*® 2x e amostras em duplicata com o volume total de 15ul. Os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos foram submetidos à análise no programa Relative Expression Software Tool (REST) 2009.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *PTHLH* apresentou amplificação no fêmur, iniciando-se no ciclo 24,495 da qPCR, sendo cerca de 8 vezes menos expressos no grupo afetado quando comparado ao grupo normal ($p < 0,01$) (Figura 1). De acordo com este resultado, o gene *PTHLH* pode estar envolvido com a Necrose da Cabeça do Fêmur em frangos de corte aos 35 dias de idade. Este gene está relacionado com regulação do desenvolvimento ósseo, atuando nas vias de transporte de íons de cálcio e nas interações entre células epiteliais e mesenquimatosas (3,4). Em camundongos, o receptor *PTH* está relacionado com a formação de osteoblastos, porém, a supressão do receptor *PTHrP tipo 1* prejudica a formação cartilaginosa, maturação, ossificação e remodelação durante a cicatrização de fraturas (3). Em aves, este gene foi primeiramente relacionado com a glândula da tireoide, promovendo o transporte de cálcio intracelular, mas estudos indicam que este gene também pode estar relacionado com o metabolismo ósseo, regulando os condrocitos da placa de crescimento tibial (5,6). O gene *PTHLH* também exerce função na estimulação e diferenciação de condrocitos, no aumento da formação e reabsorção óssea e faz parte de uma rede complexa de genes que atuam na mineralização óssea (7). A supressão deste gene nas aves pode diminuir a diferenciação e proliferação de condrocitos na placa de crescimento do fêmur influenciando diretamente na NCF, uma vez que esta anomalia se inicia com a separação da cartilagem articular do fêmur, expondo o osso e tornando-se uma porta de entrada para bactérias (8). Além disso, esse gene

pode diminuir a taxa de transporte de íons de cálcio intracelular, suprimindo o aumento da formação e reabsorção óssea, diminuindo a taxa de cicatrização de fraturas, tornando o osso susceptível a choques mecânicos. Uma vez que o *PTHLH* está relacionado com a histogênese do tecido ósseo (4), a redução em sua expressão possivelmente interfere de forma direta na ossificação. No entanto, outros estudos que envolvam a análise funcional do gene *PTHLH* em frangos são necessários para o melhor entendimento da atuação deste gene sobre o desenvolvimento da necrose da cabeça do fêmur em frangos de corte.

CONCLUSÕES

O gene *PTHLH* apresentou expressão oito vezes menor em frangos de corte afetados pela Necrose da Cabeça do Fêmur em relação aos frangos normais aos 35 dias de idade, indicando que a redução na expressão deste favorece esta condição em frangos de corte.

REFERÊNCIAS

1. 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**, [s.l.], p.3-183, 2013.
2. BISHOP, S. C. et al. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.33-40, mar. 2000.
3. WANG, Meina et al. Periosteal PTHrP Regulates Cortical Bone Remodeling During Fracture Healing. **Bone**, [s.i.], v. 81, p.104-111, dez. 2015.
4. ZHAO, Qiong et al. Expression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and its receptor (PTH1R) during the histogenesis of cartilage and bone in the chicken mandibular process. **Journal Of Anatomy**, [s.l.], v. 201, n. 2, p.137-151, ago. 2002.
5. ZUSCIK, Michael J. et al. Parathyroid hormone-related peptide regulation of chick tibial growth plate chondrocyte maturation requires protein kinase A. **Journal Of Orthopaedic Research**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.1079-1090, set. 2002.
6. PINHEIRO, Pedro Lc et al. Gene structure, transcripts and calciotropic effects of the PTH family of peptides in *Xenopus* and chicken. **Bmc Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.373-387, 2010.
7. HIRAI, T. et al. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signaling is required for maintenance of the growth plate in postnatal life. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 1, p.191-196, 20 dez. 2010.
8. ALMEIDA PAZ, ICL. Problemas locomotores em frangos de corte – Revisão. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, 2009.

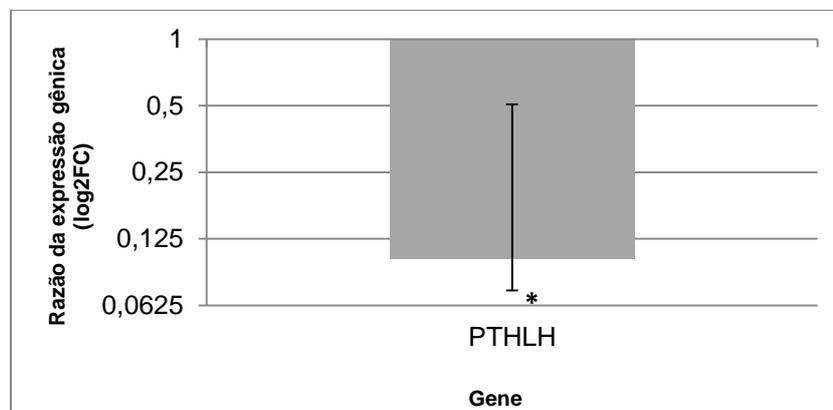


Figura 1. Razão de expressão do gene *PTHLH* na placa de crescimento do fêmur de frangos de cortes normais e afetados com Necrose da Cabeça do Fêmur, normalizada pelos genes referências (*RPL4* e *RPL30*).