

FATORES QUE INFLUENCIAM CARACTERÍSTICAS DE INTEGRIDADE ÓSSEA E EXPRESSÃO DOS GENES *COL1A2* E *RANKL* EM FRANGOS DE CORTE

Igor Ricardo Savoldi¹, Ediane Paludo², Kamilla Bleil do Carmo¹, Bruna Petry³, Adriana M. Guaratini Ibell⁴, Rafael Keith Ono⁵, Jane de Oliveira Peixoto⁶, Mônica Corrêa Ledur⁶

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

²Doutora em Ciência Animal pela Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC - Lages

³Mestranda em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC Chapecó

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁵Pós-Doutorando ICASA/Embrapa Suínos e Aves

⁶Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Palavras-chave: quantificação relativa, características fenotípicas, osso.

INTRODUÇÃO

A avicultura vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas devido ao aumento no consumo de carne de frango e seus derivados, tornando-se uma das atividades de grande destaque na agroindústria mundial. Este avanço se deve principalmente aos ganhos genéticos obtidos para ganho de peso, melhor conversão alimentar e um desenvolvimento mais acelerado até o abate. Porém, essa intensa seleção acarretou em aumento da frequência de problemas de integridade óssea em frangos (1;2). O osso é constituído por aproximadamente 20% de matriz orgânica, que tem como componente principal o colágeno tipo 1, envolvido na mineralização óssea, 10% de água e 70% de matriz inorgânica. Esta é composta por minerais que são responsáveis pela rigidez e resistência dos ossos. Algumas das características indicadoras da qualidade óssea são os teores de cinzas (CZ) e matéria seca (MS) (3,4). Porém, há poucos estudos que visam compreender as interações entre os minerais e a matriz orgânica do osso. O gene do colágeno tipo I cadeia A2 (*COL1A2*) codifica a proteína COL1A2, que é a principal componente da matriz orgânica óssea, sendo importante para a formação óssea (5,6). Já o gene ligante de fator de necrose tumoral, *membro 11* (*RANKL*) é expresso nos osteoclastos e atua na regulação e reabsorção óssea, e quando associado com a osteoprotegerina (OPG) se torna um fator determinante para a massa óssea favorecendo a osteoclastogênese (7). Desta forma, objetivou-se avaliar o teor de matéria seca e cinzas e a expressão de dois genes relacionados à integridade óssea no fêmur de aves de duas linhas paternas de corte: uma selecionada para produção de carne e outra controle (sem seleção), avaliados aos 21 e 42 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas linhas paternas de corte do programa de melhoramento genético de aves da Embrapa Suínos e Aves, sendo denominadas TT (selecionada) e LLc (controle - não selecionada). Para cada linha foram utilizados 24 animais nas idades de 21 e 42 dias, sendo 12 fêmeas e 12 machos em cada idade, criados nas mesmas condições. O fêmur da perna direita foi coletado para análises fenotípicas e o fêmur da perna esquerda para análise de expressão gênica. Para obtenção dos valores de MS, os ossos foram aquecidos em estufa com temperatura de 105°C por 16 horas. Em seguida, a MS foi pesada e o valor multiplicado por 100%. Este resultado foi então dividido pelo peso da amostra úmida obtida segundo o método 012/VI (8). Para a obtenção das CZ, as amostras foram colocadas em mufla por aproximadamente seis horas, sendo que a temperatura foi aumentada gradativamente até chegar à temperatura máxima, iniciando com 350°C gradativamente até atingir 600°C por três horas. A quantidade de cinzas foi determinada por análise gravimétrica segundo o método 018/VI (8). Para as análises de expressão gênica, o RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo recomendações do fabricante. Após, o RNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop e a integridade foi confirmada em gel de agarose 1,5%. Para a síntese de cDNA utilizaram-se 3 µg de RNA total usando o kit Super Script II First-Strand Synthesis SuperMix® (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Para a quantificação da expressão relativa dos genes foram desenhados os seguintes iniciadores na junção exon-exon utilizando o programa Primer-Blast do NCBI: *RANKL* (F:5'-gacacgccccttgaaatcagg-3'R:5'-tacgctggacttcctctgc-3') e *COL1A2* (F:5'-taagggtgaaatcggacctg-3'R:5'-accactggaaccaggaagtc-3). Foi realizada análise de variância das características por meio do procedimento *MIXED* do SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) (9), testando-se os efeitos fixos de linha, sexo, idade e suas interações, considerando-se o nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o teor de MS no fêmur, a interação entre os efeitos de sexo e linha foi significativa ($p < 0,05$; Figura 1a), sendo que a MS em machos na linha TT foi menor que na LLc, demonstrando que a seleção aplicada na linha TT tem reduzido a porcentagem de MS no fêmur dos machos desta linha ao longo dos anos. Além disso, observou-se diferença ($p < 0,05$) entre as idades, sendo a MS maior em aves com 42 dias de idade (49,45%) em relação as mais jovens (43,26%). Para o teor de CZ, houve diferença entre sexo e idade ($p < 0,05$). Fêmeas apresentaram maior teor de CZ no fêmur (20,98%) do que machos (20,33%) e aves de 21 dias tiveram valores superiores (20,96%) as aves de 42 dias de idade (20,35%). O teor de

cinzas está fortemente relacionado à resistência a quebra do osso que é uma das características mais importantes para a integridade óssea. A CZ é composta principalmente por minerais como fosfato e cálcio, sendo que o cálcio é um dos minerais mais importantes, pois está associado com a calcificação (3,4). Quanto a diferenças na expressão gênica, o gene *COL1A2* apresentou-se 2,1 vezes mais expresso nos machos do que nas fêmeas ($p < 0,05$) e 1,8 vezes mais expresso na linha TT quando comparado com LLc. O *COL1A2* é o principal componente da matriz orgânica do osso, sendo essencial para a formação e mineralização óssea (6,5). Já para o gene *RANKL*, as interações entre os efeitos idade e sexo (Figura 1b) e linha e sexo (Figura 1c) foram significativas ($p < 0,05$). Este gene foi 4 e 2 vezes mais expresso nos machos do que nas fêmeas LLc e TT, respectivamente (Figura 1b), enquanto foi 6 vezes mais expresso em machos aos 42 dias (Figura 1c). A expressão do gene *RANKL* está relacionada a reabsorção e remodelamento ósseo e, dependendo da sua ligação com *OPG* ou *RANK*, atua diretamente na densidade óssea (7,10) regulando, assim, a osteoclastogênese. Dessa forma, a expressão diferencial desses dois genes pode estar relacionada às diferenças observadas no teor de MS e CZ, com possível atuação na constituição orgânica e inorgânica do fêmur em frangos de corte.

CONCLUSÕES

A seleção praticada na linha TT levou a redução do teor de MS no fêmur de machos, podendo, desta forma, afetar a integridade óssea dessas aves. Já, as CZ foram influenciadas apenas pelo sexo e idade das aves. Além disso, foi possível observar que a expressão dos genes *COL1A2* e *RANKL* varia de acordo com o sexo, linha e idade das aves.

REFERÊNCIAS

1. COOK, M. E. Skeletal Deformities and Their Causes: Introduction. **Poultry Science**, [s.l.], v. 79, n. 7, p.982-984, 1 jul. 2000.
2. PALUDO, E. et al. The involvement of RUNX2 and SPARC genes in the bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers. **Animal**, p.1-8, 24 nov. 2016.
3. ARAÚJO, G.M; VIEITES, F.M; BARBOSA, A.A.; CARMONI JUNIOR, J.G; SANTOS, A.L; MORAES, G.H.K; ABREU, J.G; MULLER, E.S; Variação aniónica da dieta sobre características ósseas de frangos de corte: resistência á queda, composição orgânica e mineral. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** V. 63, n.4, p.954-961, 2011.
4. RATH, N.C; HUFF, G.R; BALOG, J.M; Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 1024-1032, 2000.
5. BRIONNE, A.; NYS, Y.; HENNEQUET-ANTIER, C.; GAUTRON, J. Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process. **BMC genomics**, v. 15, p. 220, 2014.
6. DENG, F. Y. et al. Tests of linkage and association of the COL1A2 gene with bone phenotypes' variation in Chinese nuclear families. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 614–619, 2003.
7. BOYCE, B.F; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-7, 2007.
8. ZANEBON, O; PASCUET, N.S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosal_2008.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2017.
9. SAS, I. I. **System Requirements for SAS® 9.3 Foundation for Microsoft® Windows®**, 2012.
10. KARSENTY, G; WAGNER, E.F. Reaching a Genetic and Molecular Review Understanding of Skeletal Development. **Developmental Cell**, [s.i], v. 2, n. 4, p.389-406, abr. 2002.

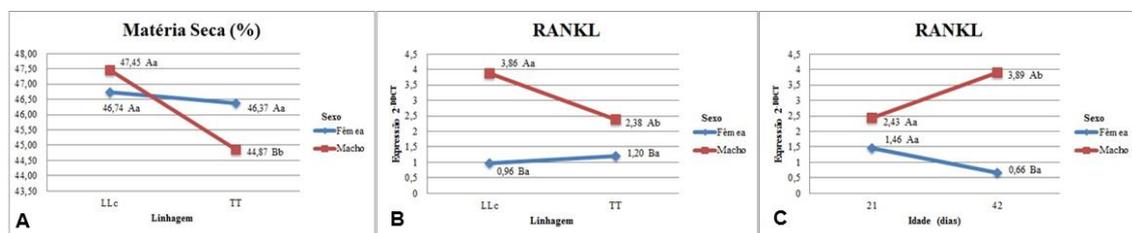


Figura 1. A) Teor de matéria seca de machos e fêmeas das linhas TT e LLc. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença dentro de linha e letras minúsculas diferentes indicam diferença dentro de sexo ($p < 0,05$). Expressão do gene *RANKL* em machos e fêmeas nas linhas TT e LLc (B) e nas idades de 21 e 42 dias (C). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença dentro de linha (B) e dentro de idade (C) e letras minúsculas diferentes indicam diferença dentro de sexo ($p < 0,05$).