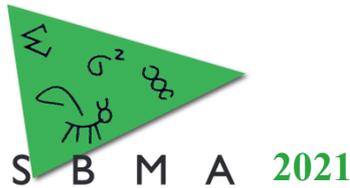


# XIV Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

18 a 19 de Outubro de 2021

*On-line*





**Perfil da expressão dos genes *PERP2*, *LEPR* e *ANGPLT5* em frangos de corte de 21 dias normais e afetados com necrose da cabeça do fêmur**

Mariane Spudeit Dal Pizzol<sup>1</sup>, Débora Ester Petry Marcelino<sup>2</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>3,4</sup>, Fernanda Tonello Neis<sup>5</sup>, Letícia Alves Salmória<sup>4</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>3,4</sup>, Mônica Corrêa Ledur<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia UDESC/Oeste, Chapecó, SC, Brasil.

<sup>2</sup>Graduação em Ciências Agrônomicas, Faculdade Concórdia, Concórdia, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Unicentro, Guarapuava, PR, Brasil.

<sup>5</sup>Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, SC, Brasil.

\*Autor correspondente: [mari\\_spudeit@hotmail.com](mailto:mari_spudeit@hotmail.com)

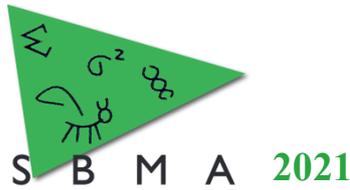
**Resumo:** Frangos de corte de crescimento rápido são susceptíveis a doenças locomotoras que causam prejuízos econômicos e restringem o bem-estar animal, sendo que a necrose na cabeça do fêmur (NCF) é o problema locomotor mais recorrente na avicultura mundialmente. Visando melhor compreender o controle genético dessa desordem óssea, o perfil de expressão de genes candidatos previamente relacionados a NCF foi investigado em frangos de corte na idade precoce de 21 dias. Foram utilizadas amostras de 8 aves, 4 normais e 4 afetadas com NCF. O RNA da placa de crescimento femoral foi extraído e purificado. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado e as amostras foram submetidas à PCR quantitativa para os genes alvo *PERP*, *LEPR* e *ANGPTL5*, que foram diferencialmente expressos entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ). Na anotação funcional dos genes expressos na placa de crescimento femoral desses animais, os 3 genes se destacaram por já terem sido associados com processos celulares importantes para regulação da matriz óssea e cartilaginosa, como apoptose e osteoblastogênese, caracterizando-os como possíveis candidatos envolvidos com a manifestação da necrose na cabeça do fêmur em aves. Essas informações contribuem para um melhor entendimento sobre a influência da genética no desenvolvimento da necrose na cabeça do fêmur em frangos de corte.

**Palavras-chave:** integridade óssea, avicultura, genética, problemas locomotores, ossificação.

**Expression profile of the *PERP2*, *LEPR* and *ANGPLT5* genes in normal and femoral head necrosis-affected broilers at 21 days of age**

**Abstract:** Fast-growing broiler chickens are susceptible to locomotor diseases that cause economic losses and restrict animal welfare. Femur head necrosis (NCF) is the most recurrent locomotor problem in poultry worldwide. To better understand the genetic control of this bone disorder, the expression profile of candidate genes previously related to NCF was investigated in broilers at an early age of 21 days. Samples from 8 broilers, 4 normal and 4 affected with NCF, were used. RNA from the femoral growth plate was extracted and purified. Subsequently, cDNA was synthesized and the samples were submitted to quantitative PCR for the target genes *PERP*, *LEPR* and *ANGPTL5*, which were differentially expressed between the two groups ( $p < 0.05$ ). In the functional annotation of the genes expressed in the femoral growth plate of these animals, the 3 genes can be highlighted for having already been associated with important cellular processes for the regulation of bone and cartilage matrix, such as apoptosis and osteoblastogenesis, characterizing them as possible candidates involved with the manifestation of femoral head necrosis in chickens. This information contributes to a better understanding of the influence of genetics on the development of femur head necrosis in broiler chickens.

**Keywords:** bone integrity, poultry, genetics, locomotor problems, ossification.



### Introdução

Os animais de produção intensiva são melhorados e selecionados geneticamente para maior produção de carne. No entanto, em alguns casos, o desenvolvimento da estrutura óssea desses animais acaba sendo prejudicado por não acompanharem o desenvolvimento da musculatura (OLKOWSKI et al., 2011). As doenças locomotoras na produção intensiva ocorrem também devido à estrutura óssea e articular não estarem preparadas para sustentar o peso que esses animais atingem em poucos dias. Como consequência, observa-se a ocorrência de lesões de degeneração femoral, podendo ou não estar associadas à infecção (OLKOWSKI et al., 2011). A necrose na cabeça do fêmur (NCF) prejudica a locomoção das aves e suas lesões podem levar a condenação de carcaças, sendo também um dos problemas locomotores que mais afeta a avicultura mundial, causando prejuízos econômicos e ao bem-estar animal. Os estudos de genética molecular podem auxiliar no entendimento do perfil de expressão gênica entre animais saudáveis e afetados com NCF e, dessa maneira, ajudar os programas de melhoramento genético a desenvolver planos de ação eficientes para reduzir a incidência de problemas locomotores na produção de frangos de corte. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos genes candidatos *TP53 apoptosis effector* (*PERP2*), *Leptin receptor* (*LEPR*) e *Angiopoietin like 5* (*ANGPTL5*) na placa de crescimento do fêmur de frangos normais e afetados com NCF aos 21 dias de idade.

### Material e Métodos

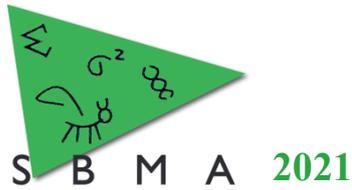
Neste estudo foram utilizadas amostras de placas de crescimento do fêmur de 8 frangos de corte de uma linhagem comercial com 21 dias de idade, sendo 4 normais e 4 afetados com necrose de cabeça do fêmur. Após a coleta das amostras, foi realizada a extração de RNA total, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguida por purificação através da coluna de sílica (Qiagen), conforme recomendação do fabricante. A concentração do RNA foi verificada com o espectrofotômetro (BioDrop) e para avaliar a integridade foi utilizado gel de Agarose à 1%. A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Primers para os genes *PERP2*, *LEPR* e *ANGPTL5* foram desenhados em junção de éxons no programa Primer-blast do NCBI. Em seguida, as reações de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas no equipamento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems), contendo: Master Mix na concentração 1X (GoTaq qPCR Master Mix 2x, Promega), 0,16  $\mu$ M de cada primer F e R, 2  $\mu$ L de cDNA na diluição 1:10 e água ultrapura para completar 15  $\mu$ L de reação total. As reações de qPCR foram feitas em duplicatas e os valores de Ct (*cycle threshold*) foram obtidos e submetidos a análise da expressão diferencial no programa REST, que utiliza um teste de aleatorização não paramétrico para comparação entre os grupos estudados. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

A genética é um fator determinante para o desenvolvimento ósseo, sendo que variações alélicas e na expressão podem afetar diretamente a fisiologia e, em alguns casos, determinar a manifestação de distúrbios severos. Por isso, a análise de expressão gênica é uma ferramenta importante na investigação de desordens metabólicas, sendo possível muitas vezes detectar a origem da desordem.

Neste estudo, os genes *PERP2*, *LEPR* e *ANGPTL5* foram respectivamente menos expressos ( $p < 0,05$ ) aproximadamente 14, 8 e 66 vezes nos animais afetados com NCF em relação aos normais. O gene *PERP2* codifica uma proteína da família de mielinas periféricas; em sua atividade celular ele interage com a proteína p53 (supressora tumoral), regulando etapas do ciclo celular e de apoptose. Este gene também foi menos expresso em frangos de corte afetados com NCF aos 35 dias de idade (PEIXOTO et al., 2019), indicando que este pode ser um gene candidato ao desenvolvimento desta condição.

Outro gene diferencialmente expresso na placa de crescimento do fêmur foi o *LEPR* que é um receptor da leptina e atua diretamente na regulação do peso corporal. Em camundongos com deficiência de leptina houve anormalidades nos ossos responsáveis pela sustentação corpórea (ossos longos), sugerindo que *LEPR* está intimamente ligado à resistência óssea. O receptor da leptina também está sendo apontado como modulador negativo da mecanossensibilidade óssea, e possíveis variações genéticas neste gene podem estar atreladas à resposta osteogênica diferencial à estimulação mecânica. Já foram identificados SNPs importantes na região codificadora de *LEPR* que podem resultar em uma proteína não funcional alterando sua expressão nos osteoblastos (KAPUR et al., 2010).



O gene *ANGPTL5* foi menos expresso em aves afetadas com NCF. Segundo ZHENG (2008), este gene tem ação inibidora da expressão de alguns fatores de transcrição importantes para a diferenciação das linhagens mieloide, eritroide e linfoide, possuindo um papel importante no reparo da epiderme e na angiogênese, na formação de novos vasos sanguíneos e nas atividades hematopoiéticas. Além disso, o *ANGPTL5* ativa vias de sinalização, como a MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases - Proteína-quinases ativadas por mitógenos), que atua em uma variedade de processos celulares, como mitose, diferenciação, apoptose e respostas ao estresse (CARGNELLO; ROUX, 2011).

Existem poucos estudos avaliando a associação entre a função desses genes com problemas locomotores. Desta forma, sua baixa expressão no grupo de animais afetados com NCF, reforça o envolvimento de vias metabólicas como a de controle de apoptose, osteoblastogênese e regulação das sinalizações de proteína-quinases na manifestação da NCF em aves.

#### Conclusão

Foi evidenciada uma menor expressão dos genes *PERP2*, *LEPR* e *ANGPTL5* em frangos com 21 dias de idade afetados com NCF, sugerindo que uma possível desregulação desses genes possa estar relacionada com a manifestação desta condição em aves. Esses resultados contribuem para melhorar a compreensão dos mecanismos moleculares que podem desencadear a NCF, bem como para o avanço do conhecimento do genoma funcional da galinha.

#### Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo projeto nº 01.11.07.002.03 da EMBRAPA. As autoras M.S.D.P, DEPM e LAS agradecem a FAPESC, ao CNPq/PIBIC e a CAPES, respectivamente, pela concessão da bolsa de estudos. MCL é bolsista de produtividade do CNPq.

#### Literatura citada

Cargnello, M., & Roux, P. P. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews**, 75(1), 50-83.

Kapur, S., Amoui, M., Kesavan, C., Wang, X., Mohan, S., Baylink, D. J., & Lau, K. H. W. 2010. Leptin receptor (Lepr) is a negative modulator of bone mechanosensitivity and genetic variations in Lepr may contribute to the differential osteogenic response to mechanical stimulation in the C57BL/6J and C3H/HeJ pair of mouse strains. **Journal of Biological Chemistry**, 285(48), 37607-37618.

Nowak, M., Köster, C., & Hammerschmidt, M. 2005. Perp is required for tissue-specific cell survival during zebrafish development. **Cell Death & Differentiation**, 12(1), 52-64.

Olkowski, A. A., Laarveld, B., Wojnarowicz, C., Chirino-Trejo, M., Chapman, D., Wysokinski, T. W., & Quaroni, L. 2011. Biochemical and physiological weaknesses associated with the pathogenesis of femoral bone degeneration in broiler chickens. **Avian Pathology**, 40(6), 639-650.

Peixoto, J. O., Savoldi, I. R., Ibelli, A. M. G., Cantao, M. E., Jaenisch, F. R. F., Giachetto, P.F., Settles, M., Zanella, R., Marchesi, J. A. P., Pandolfi, J. R. C., Coutinho, L. L., Ledur, M. C. 2019. Proximal femoral head transcriptome reveals novel candidate genes related to epiphyseolysis in broiler chickens. **BMC Genomics**, v. 20, p. 1031.

Zheng, J., & Zhang, C. 2008. Study of the Mechanisms by Which Angptl5 and IGFBP2 Support Ex Vivo Expansion of Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. **Blood**, 112 (11): 2308.