

EDIANE PALUDO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM DIFERENTES
GRUPOS GENÉTICOS DE AVES DE CORTE E POSTURA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutorado em Ciência Animal.

Orientador: Carlos André da
Veiga Lima Rosa
Co-orientadora: Jane de
Oliveira Peixoto

Lages – SC
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Paludo, Ediane

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM DIFERENTES GRUPOS
GENÉTICOS DE AVES DE CORTE E POSTURA / Ediane
Paludo. Lages - 2016.

177 p.

Orientador: Carlos André Da Veiga Lima Rosa

Co-orientadora: Jane De Oliveira Peixoto

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Expressão gênica . 2. Fêmur. 3. Linhagem
controle . 4. Linhagem selecionadas . 5. Tíbia. I.
Da Veiga Lima Rosa, Carlos Andr? . II. De Oliveira
Peixoto , Jane . III. Universidade do Estado de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal. IV. Título.

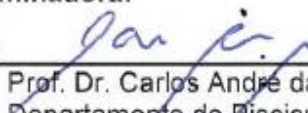
EDIANE PALUDO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM DIFERENTES
GRUPOS GENÉTICOS DE AVES DE CORTE E POSTURA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Carlos Andre da Veiga Lima Rosa
Departamento de Piscicultura e Apicultura - UDESC

Membros:


Prof. Dra. Carla Ivane Ganz Vogel
Departamento de Produção Animal e Alimentos - UDESC


Prof. Dr. Erik Amazonas Almeida
Departamento de Medicina Veterinária – UFSC


Dra. Adriana Mercia Guaratini Ibelli
EMBRAPA Suínos e Aves


Dr. Rafael Keith Ono
EMBRAPA Suínos e Aves

Lages, 23/02/2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela benção espiritual, pela calma, pela fé concedida tanto no percorrido dos quatro anos como nos anos antecedentes a esta formação.

Agradeço à minha mãe Victória (*in memoriam*) e ao meu pai Armando (*in memoriam*), pela educação concedida, incentivo, força espiritual, tranquilidade, exemplo de vida.

Agradeço as minhas irmãs Elaine e Eliane e ao meu irmão Edivan, juntamente com meus cunhados Arli e Diogo e minha cunhada Indianara, pelo incentivo ao estudo. Obrigada pela compreensão e carinho da pessoa especial Cleiton.

Agradeço ao meu orientador Carlos André da Veiga Lima Rosa, por me aceitar como orientada, por me incentivar e orientar sempre.

Agradeço as pesquisadoras da Embrapa Suínos e Aves, Mônica Correa Ledur e Jane de Oliveira Peixoto, pela parceria feita com o projeto de pesquisa, pelos ensinamentos, e pelos incentivos no período de bolsa sanduiche e na conclusão desta tese. Jane obrigada por me co-orientar durante a construção da tese.

Agradeço à professora Carla Ivane Ganz Vogel, por deixar executar a monitoria da bolsa e cursar a disciplinas de docência em suas aulas. Agradeço ainda pela participação em alguns seus projetos de pesquisa no início do meu doutorado e pelo seu incentivo na carreira acadêmica.

Agradeço a todos os alunos e professores do laboratório de Bioquímica da Udesc, em especial ao professor Luiz Claudio Miletto, e as alunas da época.

Luiza, Fran, Julio, Paulo (*in memoriam*) e Diana. Com isso aproveito em agradecer também aos meus colegas de disciplinas cursadas durante estes quatro anos, pelos grandes grupos de estudos que se formaram.

Muito obrigada aos amigos e colaboradores da Embrapa Suínos e Aves, em especial a Adriana, Alexandre, José, Maurício, Diego, Leticia, Bruna, Jorge, Igor, Raira, e todos os demais que sempre tivemos muita amizade.

Muito Obrigada às pessoas que morei junto, que não foram somente divisoras de casa e sim amigas irmãs, obrigada Marina, Nathalia, Greicy, Magda e Luana.

Muito obrigada às pessoas que me incentivaram e me ajudaram na conquista da bolsa para parte do doutorado em Barcelona. Muito obrigada as pessoas que me receberam e me auxiliaram lá, juntamente com o meu orientado do CRAG Josep Maria Folch e meus colegas, Manuel Revilla, Ana Puig e Daniel Crespo. Além disso, os amigos brasileiros que lá conheci: Jacson, Leonardo, Tainã e Fabiana.

Muito Obrigada aos órgãos financiadores CNPq, Capes, PROMOP e BRITISH POULTRY SCIENCE, pelas bolsas e prêmios recebidos.

RESUMO

PALUDO, Ediane. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS DE AVES DE CORTE E POSTURA. 2016. 177f

O crescimento da produção de proteína animal tem aumentado nos últimos anos, em especial na avicultura brasileira em que o país passou de terceiro maior produtor para segundo maior produtor de carne de frango. Além disso, ainda há produção de ovos, que apesar de não ser uma produção tão expressiva para exportação, é suficiente para o mercado interno. Este grande avanço na produção mundial foi devido as grandes melhorias genética, nutricionais e sanitárias. Porém com este crescimento, também são encontrados alguns problemas indesejáveis ocasionados por causas multifatoriais, que provocam perdas econômicas na produção. Entre estes, estão os problemas que podem estar relacionados à genética das aves. Há muito tempo, as aves vêm sendo selecionadas para a maior produção de carne e ovos, para múltiplas características, mas a estrutura óssea destas aves não acompanhou esse melhoramento. Estudos apontam que problemas dos ossos apresentam herdabilidade moderada, e que muitos genes estão ligados à resistência dos ossos. Desta maneira, este estudo teve o objetivo de avaliar características fenotípicas e a expressão de alguns genes relacionados com a integridade óssea das aves, em aves de duas linhagens de postura e duas linhagens de corte, sendo uma selecionada e um controle de diversas idades. Além disso, foi realizada a análise de

expressão de genes relacionados com a integridade óssea em aves comerciais normais e com condronecrose bacteriana com osteomielite. Nas linhagens selecionadas e controle foram avaliadas características químicas, morfométricas, biomecânicas e expressão de genes relacionados com a integridade óssea. Para as linhagens de postura foi analisada a expressão de 10 genes no tecido ósseo da tíbia e nas linhagens de corte foram analisados 11 genes no tecido ósseo do fêmur. Na linhagem comercial foi avaliada a expressão de 12 genes no tecido ósseo do fêmur. Nas aves de postura, foi possível concluir que há diferença significativa ($p < 0,05$) para algumas características fenotípicas e de expressão gênica entre a linhagem selecionada e linhagem controle, e entre as diferentes idades avaliadas. Em especial, as aves de 65 semanas da linhagem controle apresentaram maior expressão dos genes, condizendo com uma regeneração eficiente do sistema ósseo desta população quando comparada com a linhagem selecionada. Nas aves de corte, foi possível concluir que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a linhagem selecionada e a linhagem controle, e entre os sexos para diversas características fenotípicas e as expressões dos genes estudados. Nas aves comerciais, concluímos que os genes *RUNX2* e *SPARC* foram quatro vezes menos expressos nos animais afetados do que nos animais não afetados, com isso o baixo nível de expressão dos genes *RUNX2* e *SPARC*, podem reduzir a vascularização e mineralização óssea, aumentando os problemas esqueléticos em frangos de corte. Desta maneira, os resultados deste trabalho permitiram um melhor entendimento do metabolismo ósseo em aves de produção, dados que são escassos na literatura. Porém, novos estudos se fazem necessários para ampliar os conhecimentos em relação dos problemas locomotores

com os programas de melhoramento genético, visando melhorar a qualidade do sistema esquelético das aves.

Palavra-chave: Expressão gênica – fêmur – linhagem controle – linhagem pura – tíbia

ABSTRACT

PALUDO, Ediane. Characterization of the gene expression profile related to the bone integrity indifferent genetic groups of birds and cutting position. 2016. 177f

The increase of animal protein production has increased in recent years, especially in the Brazilian poultry industry in the country has the third largest producer second largest producer of chicken meat. In addition, there is egg production, which although not such a significant production for export, is sufficient for the internal market. This breakthrough in world production was due to the great genetic, nutritional and health improvements. But with this growth, they are also found some undesirable problems caused by multifactorial causes, which cause economic losses in production. Between them are the problems that may be related to genetics of birds. A long time ago the birds have been selected for increased production of meat and eggs, for multiple features, but the bone structure of these birds did not follow this improvement. Studies show that bone problems have moderate heritability, and that many genes are linked to the strength of bones. This manner, this study had the objective to evaluate phenotypic characteristics and the expression of genes related to the bone integrity of birds in poultry in two position lines and two cutting lines, one selected and control of various ages. Moreover, it was performed gene expression analysis related to the bone integrity under normal commercial poultry condronecrose and bacterial osteomyelitis. Were evaluated on selected lines and control chemical, morphological, biomechanical

and expression of genes related to the bone integrity. For lines posture was analyzed the expression of 10 genes in the bone tissue of the tibia and the cutting lines 11 genes were analyzed in the bone tissue of the femur. In commercial line was assessed the expression of 12 genes in the bone tissue of the femur. On laying hens, it was concluded that there is significant difference ($p < 0.05$) for some phenotypic and gene expression characteristics between the selected line and line control, and between the different evaluated ages. In particular, birds of 65 weeks of the control strain showed increased gene expression, consistently with efficient regeneration of osseous system of this population compared with the selected lineage. On broilers, it was concluded that there are significant differences ($p < 0.05$) between the selected line and the line control, and between the sexes for various phenotypic characteristics and expressions of the genes studied. In commercial poultry, we conclude that *RUNX2* and *SPARC* genes were four times less expressed in the affected animals than in animals not affected with this low level of expression of *RUNX2* and *SPARC* gene can reduce vascularization and bone mineralization, increasing problems skeletal in broilers. This manner, the results of this study allowed for a better understanding of bone metabolism in poultry production, data are scarce. However, further studies are needed to increase knowledge regarding the locomotor problems with breeding programs to improve the quality of the skeletal system of birds.

Key-words: Gene expression – femur – control line – pure line – tibia

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP: proteína morfológica do osso

BMP2: gene da proteína morfogenética óssea tipo 2

Ca: cálcio

CALB1: gene da calbidina

CALM2: gene da calmodulina 2

CC: linhagem de aves de postura melhorada

CCc: linhagem de postura controle

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

cm: centímetros

Col1A2: gene da cadeia polipeptídica alfa 2 do colágeno tipo I

Ct: ciclo limiar

CZ: teor de cinzas

DT: discondroplasia tibial

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Ensembl ID: identificação do banco de dados *Ensembl*

FAWC: *Farm Animal Welfare Council*

FHN: necrose da cabeça do fêmur

g: força gravitacional

h^2 : herdabilidade

IBSP: gene da sialoproteína óssea

kg: quilograma

LEPR: gene do receptor da leptina

LLc: linhagem de corte controle

m²: metros quadrados

Mg: magnésio

MS: teor de matéria seca

P: fósforo

qPCR: reação da cadeia polimerase em tempo real

QTLs: locos que controlam características quantitativas

RANKL ou *TNFSF11*: gene do fator ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ou fator ligante do membro 11 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral – TNF

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

RUNX2: gene do fator de transcrição relacionado ao gene runt2

SMAD1: gene da proteína membro 1 da família SMAD

SNPs: polimorfismos de um único nucleotídeo

SPARC: gene da osteonectina ou proteína ácida secretada rica em cisteína

SPP1: gene da osteopontina

TNFRSF11B: gene da osteoprogerina

TT: linhagem de aves de corte melhorada

Zn: zinco

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1: Produção brasileira de carne de frango (milhões de toneladas).43
- Figura 2: Abate de frango por estado em 2014.....44
- Figura 3: Produção de ovos por estado no ano de 2013.....45
- Figura 4: Secção longitudinal do fêmur.....50

Capítulo II

- Figura 1. Medidas de Espessura, Flexibilidade e Cinza da Tíbia com interação entre idade e linhagem.....82
- Figura 2. Espessura basal da casca do ovo.....85
- Figura 3. Expressão dos genes *CALM2* (A), *IBSP* (B), *RANKL* (C), *SPP1* (D), *RUNX2* (E) e *SPARC* (F) na tíbia de aves de postura em diferentes idades.....88

Capítulo III

- Figura 1. Avaliação do peso, comprimento e espessura dos ossos tíbia e fêmur.....117
- Figura 2. Variações na força de quebra e flexibilidade dos ossos tíbia e fêmur nas linhagens de corte.....118
- Figura 3. Teores de Matéria Seca dos ossos tíbia e fêmur das linhagens de corte.....119

Figura 4. Composição química dos ossos tíbia e fêmur das linhagens de corte em diferentes idades.....	120
Figura 5. Expressão dos genes <i>CALM2</i> (A) e <i>SMAD1</i> (B) nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias.....	122
Figura 6. Expressão dos genes <i>IBSP</i> (A) e <i>RANKL</i> (B), A nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias..	123
Figura 7. Expressão dos genes <i>RUNX2</i> (A) e <i>SPARC</i> (B), nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias.....	123
Figura 8. Expressão dos Genes <i>COL1A2</i> (A) e <i>SPP1</i> (B), nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias.....	124
Figura 9. Expressão dos Genes <i>BMP2</i> (A) e <i>TNFRSF11B</i> (B), nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias.....	125

Capítulo IV

Figure 1. Ratio of gene expression in femur between affected and control group, normalized by the reference gene <i>HMBS</i> . * $p < 0.05$	159
Figure 2. Gene network among all genes evaluated. Circles represent genes and connecting lines represent interactions between genes, according the active prediction methods of Stringdb (homology, textmining, databases, experiments, coexpression, cooccurrence, gene fusion or neighborhood).	161

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. <i>Primers</i> usados na análise de qPCR.....	77
Tabela 2. Níveis descritivos de probabilidade do teste F a análise de variância para as variáveis avaliadas.....	79
Tabela 3. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis avaliadas, por idade.....	81
Tabela 4. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis avaliadas, por linhagem e idade.....	83
Tabela 5. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis avaliadas no fêmur, por linhagem e idade.....	84
Tabela 6. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis de ovo e casca de ovo avaliadas, por linhagem e idade.....	86
Tabela 7. Expressão dos genes <i>BMP2</i> , <i>CALB1</i> e <i>COL1A2</i> na tíbia de aves de postura em diferentes idades.....	89

Capítulo III

Tabela 1. <i>Primers</i> usados na análise de qPCR.....	114
Tabela 2. Peso vivo das aves das linhagens puras TT e LLc aos 21 e 42 dias de idade.....	115

Capítulo IV

Table 1. Primers sequences, Genbank accession number, Ensembl ID and amplicon sizes.....159

Table 2. Relative gene expression (fold change) for all genes studied between affected and control groups....160

Table 3. GO of biological processes overrepresentation test obtained according the Pantherdb.....162

SUMÁRIO

1CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	41
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	42
1.1.1 <i>Produção Avícola Nacional</i>	<i>42</i>
1.1.2 <i>Programas de melhoramento genético de aves no Brasil</i>	<i>46</i>
1.1.2.1 Linhagens das aves da Embrapa	47
1.1.3 <i>Tecido Ósseo.....</i>	<i>48</i>
1.1.4 <i>Problemas relacionados à integridade óssea na avicultura de corte e postura.....</i>	<i>51</i>
1.1.5 <i>Fatores genéticos associados a problemas locomotores</i>	<i>53</i>
1.1.6 <i>Genes relacionados ao tecido ósseo</i>	<i>55</i>
1.1.6.1 Gene da Proteína Morfogenética Óssea tipo 2 (BMP2)	55
1.1.6.2 Gene da Osteopontina (SPP1)	56
1.1.6.3 Gene da Osteopogerina - OPG (TNFRSF11B).....	57
1.1.6.4 Gene da Osteonectina (SPARC)	58
1.1.6.5 Gene da Sialoproteína óssea - BSP ou IBSP (IBSP)	58
1.1.6.6 Gene da Calbindina (CALB1).....	59
1.1.6.7 Gene do Fator de transcrição relacionado ao gene runt2 (RUNX2) 60	
1.1.6.8 Gene da Calmodulina 2 (CALM2).....	60
1.1.6.9 Gene da cadeia polipeptídica alfa 2 do colágeno tipo I (COL1A2) .	61
1.1.6.10 Gene do Fator ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ou fator ligante do membro 11 da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral – TNF (RANKL)	61
1.1.6.11 Gene da proteína membro 1 da família SMAD (SMAD1)	62
1.1.6.12 Gene do Receptor da Leptina (LEPR)	63
1.2 OBJETIVO GERAL	65
1.2.1 <i>Objetivos Específicos</i>	<i>65</i>
2CAPÍTULO II. INFLUÊNCIA DA SELEÇÃO GENÉTICA SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM LINHAGENS DE POSTURA EM DIFERENTES IDADES	67
2.1 RESUMO	67
2.2 ABSTRACT.....	68

2.3	INTRODUÇÃO	69
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.4.1	<i>Animais experimentais e material biológico</i>	71
2.4.2	<i>Características fenotípicas</i>	72
2.4.2.1	Características morfométricas e biomecânicas	72
2.4.2.2	Composição química dos ossos	73
2.4.2.3	Fenótipos medidos no ovo e na casca do ovo	74
2.4.3	<i>Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA</i>	75
2.4.4	<i>Análise de RT PCR em Tempo Real</i>	76
2.4.5	<i>Análises Estatísticas</i>	78
2.5	RESULTADOS.....	78
2.5.1	<i>Peso vivo</i>	78
2.5.2	<i>Características morfométricas e biomecânicas dos ossos</i>	81
2.5.2.1	Características de composição química do osso	83
2.5.3	<i>Fenótipos medidos no ovo e na casca do ovo</i>	84
2.5.4	<i>Expressão gênica na tíbia</i>	86
2.6	DISCUSSÃO.....	89
2.7	CONCLUSÃO	97
2.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
3CAPÍTULO III. FATORES QUE INFLUENCIAM A VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA NO FÊMUR DE LINHAGENS DE CORTE		105
3.1	RESUMO	105
3.2	ABSTRACT	106
3.3	INTRODUÇÃO	108
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	109
3.4.1	<i>Coleta de Material Biológico</i>	109
3.4.2	<i>Mensuração fenotípica</i>	110
3.4.3	<i>Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA</i>	112
3.4.4	<i>Análise de RT PCR em Tempo Real</i>	112
3.4.5	<i>Análises Estatísticas</i>	114
3.5	RESULTADOS.....	115
3.5.1	<i>Medidas fenotípicas</i>	115
3.5.2	<i>Análise de expressão gênica</i>	121
3.6	DISCUSSÃO.....	125

3.7	CONCLUSÃO	131
3.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
4CAPÍTULO IV. DOWNREGULATION OF RUNX2 AND SPARC GENES AND THE MANIFESTATION OF BACTERIAL CHONDRONECROSIS WITH OSTEOMYELITIS IN BROILERS		139
4.1	ABSTRACT	139
4.2	INTRODUCTION	140
4.3	MATERIAL AND METHODS	142
4.3.1	<i>Experimental animals and husbandry</i>	142
4.3.2	<i>RNA extraction and cDNA synthesis</i>	143
4.3.3	<i>Real time quantitative PCR</i>	144
4.3.4	<i>Data analysis</i>	145
4.3.5	<i>Identification of gene interactions and enrichment analysis</i>	145
4.4	RESULTS	145
4.5	DISCUSSION	146
4.6	REFERENCES	151
5CONSIDERAÇÕES FINAIS		163
6REFERÊNCIAS		165

1 Capítulo I. Introdução

A avicultura é uma atividade relevante para a economia brasileira, sendo o Brasil o maior exportador mundial de carne e derivados de aves e o segundo maior produtor mundial. Essa posição de destaque foi atingida graças a inúmeras melhorias obtidas nas áreas de nutrição, sanidade, manejo e melhoramento genético (SOUZA et al., 2015).

No setor agropecuário, a avicultura foi uma das atividades que mais se desenvolveu e se destacou nos últimos anos. Grande parte do avanço obtido foi devido à melhoria genética dos plantéis de aves. Segundo Havenstein, Ferket e Qureshi (2003), a taxa de crescimento em frangos de corte aumentou significativamente nas últimas décadas, tal como a quantidade da postura de ovos em um ciclo de vida. Entretanto, associadas a esse progresso obtido pelo melhoramento tradicional, surgiram algumas características correlacionadas indesejáveis, como o aumento de problemas metabólicos, deposição de gordura na carcaça, redução da fertilidade, resposta vacinal e resistência às doenças infecciosas, todas em aves de corte. Em poedeiras, houve aumento da incidência de osteoporose e problemas na qualidade da casca do ovo (BURT; KINGDOM, 2002).

Por meio de intenso melhoramento genético, as empresas de genética avícola têm produzido linhagens cada vez mais precoces e com maior desenvolvimento muscular para as aptidões de carne, e para aves de postura um menor intervalo de tempo entre as posturas de ovos. Nestas gerações de melhoramento animal, o desenvolvimento do tecido ósseo não tem acompanhado estes processos fisiológicos dos demais tecidos corpóreos, possibilitando a ocorrência da incidência de

problemas de pernas e fragilidade dos ossos. Estes problemas representam perdas econômicas significativas para a indústria avícola, por aumentar o índice de descarte no abatedouro em função de carcaças mal desenvolvidas e fraturas, além de causar perdas relativas ao desempenho das aves (SOUZA, 2012).

De acordo com Cook (2000), os fatores genéticos influenciam consideravelmente o desenvolvimento do esqueleto das aves. Bishop et al. (2000) estimaram a herdabilidade desses problemas como moderada ($h^2=0,4$), indicando o melhoramento animal como potencial para reduzir esse problema. As empresas de genética de aves estão realizando grandes esforços para reduzir a incidência desses problemas, no entanto, os ganhos genéticos ainda são insuficientes para eliminar essas anomalias. Além disso, muitas das características ligadas à integridade óssea são de difícil mensuração, o que gera dificuldade na seleção dos animais pelo método tradicional. Dessa forma, o uso da expressão dos genes poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos genéticos associados a esses problemas visando tornar a seleção para estas características mais efetiva.

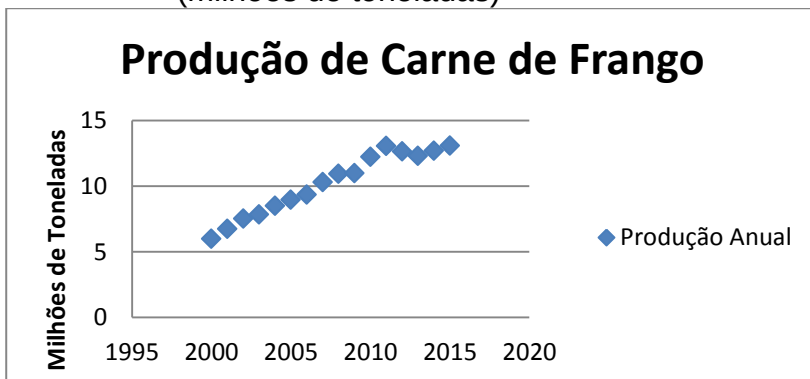
1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 Produção Avícola Nacional

O Brasil vem se destacando na produção de carne de frango nos últimos anos, em especial nos últimos 15 anos, apresentando um aumento de 5,98 milhões de toneladas no ano 2000 para 12,69 milhões de toneladas no ano 2014 (Figura 1). O melhor índice da produção foi obtido no ano de 2011 com 13,05 milhões de toneladas de carne de frango produzida (ABPA, 2015). Em 2014 a

produção foi de 12,69 milhões de toneladas (ABPA, 2015), em 2015 foi de 13,13 milhões de toneladas.

Figura 1: Produção brasileira de carne de frango (milhões de toneladas)



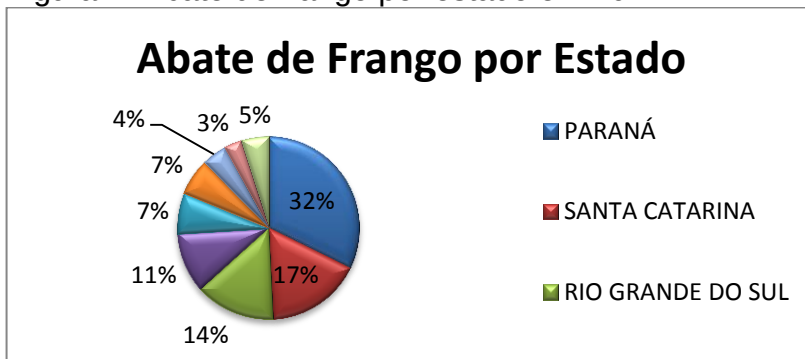
Fonte: Modificado ABPA (2015).

Os Estados que apresentam a maior produção nacional e a maior exportação se concentram nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. O Paraná, seguido de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os três estados que apresentaram maiores números de abate de frango no ano de 2013 (FIGURA 2) e, por consequência, são os maiores exportadores de carne de frango do Brasil (ABPA, 2015). Além disso, outros Estados com menor produção apresentam grande potencial de crescimento neste setor produtivo.

A produção brasileira de carne de frango atingiu cerca de doze milhões de toneladas em 2013. Grande parte dessa produção é destinada ao mercado externo, incluindo produtos *in natura*, industrializados e cortes (ABPA, 2015). Dentre os destinos da carne de frango brasileira, encontram-se países da União Européia (7,5%) e Japão (1,9%), que possuem legislação restritiva

de condições de alojamento com relação ao bem-estar das aves.

Figura 2: Abate de frango por estado em 2014



Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, modificada por ABPA (2015).

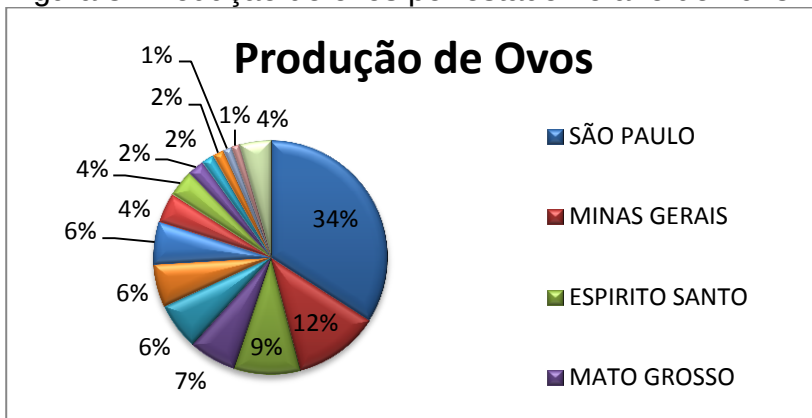
Além da importância econômica da carne de frango, o Brasil vem crescendo na produção de ovos. Em 2010, a produção nacional foi de 28,8 bilhões de ovos no ano, aumentando em 2011 para 31,5 bilhões de ovos ao ano, em 2012 para 31,7 bilhões de ovos, em 2013 para 34,1 bilhões de ovos e em 2014 foi de 37,2 bilhões de ovos produzidos ao ano (ABPA, 2015). Essa produção é destinada ao mercado interno, sendo que apenas 1% da produção é destinada à exportação, na forma *in natura* e processados (ABPA, 2015).

Os Estados que mais produzem ovos se diferenciam daqueles com maior produtividade de carne, destacando-se na produção de ovos: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Mato Grosso (Figura 3).

Para dar continuidade ao crescimento da produção avícola, tanto de carne quanto de ovos, as granjas produtoras de aves de postura e de corte do Brasil devem respeitar as cinco liberdades impostas pela União Brasileira de Avicultura (UBA, 2008a, 2008b) que

estão embasadas nas cinco liberdades definidas pela FAWC (Farm Animal Welfare Council).

Figura 3: Produção de ovos por estado no ano de 2013



Fonte: ABPA (2014)

O continente Europeu tem liderado as práticas produtivas preocupando-se com o bem-estar animal. Inclusive, existem várias organizações não governamentais sugerindo normas bem definidas que norteiam a criação de aves. Estas normas determinam o padrão de alojamento, densidade populacional, transporte e abate de aves na Comunidade Europeia, além de ser possível constituir barreiras para o ingresso de carne importada de outros continentes. Estas organizações não governamentais seguem as cinco liberdades do bem-estar animal que resumem as necessidades básicas para uma criação racional e humanitária, sendo livres de fome, sede e desnutrição; livre de desconforto; livre de dor, ferimentos e doenças; liberdade para expressar padrões normais de comportamento; e livre de medo e angústia (FAWC, 2004). Para a produção de ovos as aves devem ser criadas: livres de medo e angústia; livres de dor,

sofrimento e doenças; livres de fome e sede; livres de desconforto; e livres para expressar seu comportamento normal, sendo indicada a densidade para alojamento das aves, em que permita o movimento das aves e que todas as aves possam deitar ao mesmo tempo sem amontoamento de uma sobre a outra (UBA, 2008a).

1.1.2 Programas de melhoramento genético de aves no Brasil

No Brasil, o melhoramento de aves começou por volta de 1960, na região Sudeste, mais especificamente no Estado de São Paulo (LEDUR et al., 2011). No decorrer dos anos, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul também começaram a desempenhar trabalhos em melhoramento genético de aves. Em Santa Catarina, os trabalhos se concentraram especificamente na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Unidade de Suínos e Aves.

O programa de melhoramento genético da Embrapa Suínos e Aves começou no ano de 1982 com o objetivo de desenvolver linhagens nacionais com material genético próprio, deixando de ser dependente do material genético Norte-Americano. Em 1985, o Ministério da Agricultura atribuiu à Embrapa a responsabilidade de dar continuidade ao programa de melhoramento da Granja Guanabara (LEDUR et al., 2011), a qual até este período era responsável pelo melhoramento de aves nacional. O programa de melhoramento da Embrapa gerou material genético de qualidade, no entanto as empresas multinacionais de genética animal continuam responsáveis pelo comércio de aves produzidas no Brasil, deixando o país totalmente dependente da genética avícola importada.

O trabalho desenvolvido no Brasil, nas linhagens de corte, objetivou melhorar o peso corporal, conversão alimentar, rendimento de carcaça, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade, reduzir a gordura abdominal e doenças metabólicas. As linhagens de postura foram selecionadas para maior produção de ovos, peso de ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e reduzir o peso corporal (NONES, 2004).

Depois de encerrado a fase de desenvolvimento de produtos comerciais, os trabalhos foram direcionados para a manutenção e caracterização de bancos de germoplasma das linhagens pertencentes ao programa e estudos genômicos de aves, com a intenção de explorar a genômica no uso do melhoramento genético avícola (LEDUR et al., 2011).

Em 2010 a Embrapa firmou acordo com a empresa Gramado Avicultura para o desenvolvimento de produtos comerciais de aves de postura. Assim, essa empresa colocou à disposição para os produtores de todo o Brasil, algumas linhagens desenvolvidas nos últimos anos pela Embrapa (LEDUR et al., 2011).

1.1.2.1 *Linhagens das aves da Embrapa*

A Embrapa, com incentivo do governo federal, desenvolveu um programa de melhoramento de aves completo, voltado à formação de pacotes comerciais de aves tanto de corte quanto de postura que pudessem ser utilizados por empresas brasileiras.

As aves da linhagem de corte tiveram sua formação pelos cruzamentos entre as raças Cornish, Hampshire e White Plymouth Rock no ano de 1985. Em sua seleção, objetivou-se melhorar o peso corporal, conversão alimentar, rendimento de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade, e a redução da

gordura abdominal e das doenças metabólicas. Dentre as linhagens de corte estão as linhagem TT e a LLc. A linhagem TT é uma linhagem paterna a qual vem sendo melhorada para as características citadas anteriormente, e a linhagem LLc (linhagem de corte controle), vem sendo mantida sem seleção para múltiplas características (NONES, 2004). Estas duas linhagens são mantidas até hoje separadas, utilizadas como modelo de estudo de linhagens puras. Além disso, a linhagem TT é usada para originar o produto comercial da Embrapa linha macho Embrapa 021.

As aves da linhagem de postura CC e CCc foram originadas a partir de cruzamentos da raça White Leghorn no ano de 1989. Essas aves foram divididas em dois grupos, um com as aves destinada a seleção para múltiplas características para postura (CC) e da mesma forma que as aves de corte, foi mantido um grupo com aves controle (CCc), onde as aves são mantidas sem seleção. A linhagem melhorada foi selecionada para a melhor produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e reduzir o peso corporal (NONES, 2004). As duas linhagens atualmente são conservadas como patrimônio genético da Embrapa. Além das linhagens serem usadas como modelo para estudos genômicos, a linhagem CC participa na formação do produto comercial Embrapa 011 (postura industrial).

1.1.3 Tecido Ósseo

O tecido ósseo em seu conjunto desempenha diversas funções importantes, tal como sustentação do corpo, locomoção, proteção de órgãos internos e reserva metabólica (lipídios e minerais). Os tipos celulares

componentes do osso são: os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Estes elementos celulares são responsáveis pela síntese da matriz óssea e mineralização, e são determinantes para os fatores químicos, geométricos e resistência dos ossos. O tecido ósseo é caracterizado por processos dinâmicos de formação e eliminação óssea (RATH; HUFF; HUFF; BALOG, 2000). Os ossos são constituídos por aproximadamente 70% de minerais, 22% de matriz orgânica e 8% de água (PIZAURO JUNIOR; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

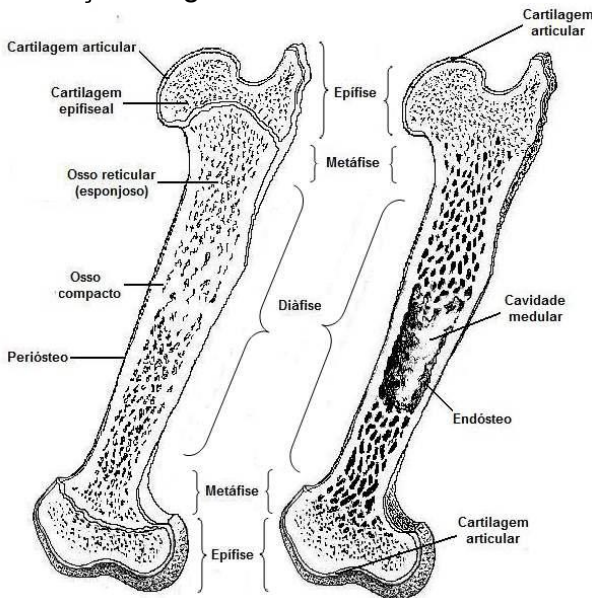
O esqueleto é composto por ossos chatos e ossos longos, os quais se diferem pela sua formação. Ossos chatos incluem os ossos do crânio, costelas e vértebras, enquanto que os ossos longos são encontrados nos braços e pernas (RUBIN, 2008).

Existem dois tipos de ossos, quando considerado macroscopicamente, o trabecular constituído por uma estrutura com aspecto esponjoso, e o cortical (Figura 4) mais sólido e formado por lamelas ósseas. Os dois tipos de ossos se diferenciam pela densidade da matriz mineralizada, distribuição das células e vasos sanguíneos, e a área ocupada pela medula óssea (VIEIRA, 1999). Uma das maiores diferenças encontradas é que a matriz de colágeno do osso compacto está organizada em lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Já no caso dos ossos trabeculares, estes possuem amplos espaços ósseos e intercomunicantes formando uma rede chamada de trabéculas, que abrigam a medula óssea onde ocorre a produção sanguínea a partir das células mesenquimais (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os osteócitos são encontrados no interior da matriz óssea dentro dos canálculos que estabelecem

contato através de junções comunicantes, por onde passam pequenas moléculas e íons de um osteócito para outro, pois são os responsáveis pela mineralização da matriz óssea (LIAN; STEIN, 2006). O seu formato é achatado em forma de amêndoa e exibe pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e o núcleo com cromatina condensada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 4: Secção longitudinal do fêmur



Esquerdo: Imaturo (osso em fase de crescimento). Direito: Maduro (osso com placas de crescimento estáveis). Fonte: Modificado de Frandson (2005)

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea (LIAN; STEIN, 2006). Os osteoblastos estão dispostos lado a lado na superfície óssea, quando em intensa atividade tem o formato

cuboide, porém quando em baixa atividade tornam-se achatados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células especializadas em osteoclastos são grandes, móveis e extensamente ramificadas, as ramificações são irregulares com forma e espessura variáveis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os osteoclastos são os responsáveis pela reabsorção dos tecidos calcificados (LIAN; STEIN, 2006).

1.1.4 Problemas relacionados à integridade óssea na avicultura de corte e postura

Embora a função do tecido ósseo seja muito importante, pouca atenção tem sido dada quanto a sua integridade em animais de produção. Nutrientes, genética, micotoxinas e práticas de manejo afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento do esqueleto (COOK, 2000). Desde 1930, inúmeras causas das deformidades do esqueleto em aves têm sido identificadas.

Em frangos de corte diversas anomalias ósseas vêm sendo relatadas na produção. A discondroplasia tibial (DT) é caracterizada pela formação de uma massa anormal de cartilagem, não vascularizada e pouco mineralizada, que ocupa a extremidade proximal dos ossos longos, principalmente na tíbia. Aves de rápido crescimento são mais susceptíveis a apresentarem a lesão (PRAUL et al., 2000). A DT é um distúrbio que causa queda de desempenho corporal e descarte de aves no abatedouro causando perdas relevantes. Aves que sofrem com DT tornam-se incapazes de caminhar normalmente ou começam a mancar devido à deformidade dos ossos. Aves com lesões avançadas são mais propensas a sofrerem fraturas (VELLEMAN, 2000).

A Necrose da Cabeça do Fêmur (FHN) é uma infecção da região proximal do fêmur e é caracterizada por descolamentos e escamações de diferentes dimensões, dependendo da severidade. Atualmente, essa anomalia tem sido conhecida como condronecrose bacteriana com osteomielite (BCO). Apesar de sua patogênese não estar totalmente elucidada, fatores como genética, manejo, idade, o rápido crescimento e nutrição já foram relacionados com a susceptibilidade a essa doença (MCNAMEE; SMYTH, 2000; KNOWLES et al., 2008; WIDEMAN; PRISBY, 2013).

Também são frequentes as anormalidades valgus-varus. A rotação da tíbia é uma deformação não infecciosa encontrada nos ossos longos dos frangos de corte. Esta afecção é caracterizada pela rotação lateral para fora (varus) ou para dentro (valgus) e entortamento da parte distal do tibiotarso e da parte proximal do tarsometatarso (WISE, 1975).

Considerando a avicultura de postura, a fragilidade da estrutura óssea ou osteoporose é um dos principais problemas relacionados à integridade óssea. Webster (2004) estimou que 80 a 89% das poedeiras comerciais apresentavam osteoporose. Budgell e Silversides (2004) sugerem que cerca de 20% das poedeiras sofrem fraturas ósseas. Segundo Mazzoco (2006), as fraturas ósseas devido à osteoporose constituem-se em um dos mais sérios problemas do sistema esquelético nas atuais linhagens de aves de postura comercial. Além disso, a osteoporose possui implicações ao bem-estar das aves, tornando-se um grave problema durante o manejo que antecede o abate.

A manifestação da osteoporose é atribuída a duas causas principais: à seleção genética para alta produtividade, a que as aves foram submetidas e ao confinamento em gaiolas. O risco do desenvolvimento

dessa doença metabólica depende entre outras variáveis, do pico da massa óssea alcançado durante o crescimento e, posteriormente, da perda dessa mesma massa óssea durante a fase adulta (MAZZUCO, 2006).

Nos Estado Unidos, o prejuízo por problemas locomotores em galinhas é cerca de 120 milhões de dólares (SULLIVAN, 1994). No Brasil não existem estudos em que demonstram o impacto econômico da produção devido aos problemas locomotores das aves, a tendência é ser igual ou maior que os outros países devido a grande produção.

1.1.5 Fatores genéticos associados a problemas locomotores

Os problemas locomotores podem estar relacionados por diversos fatores da produção, tal como bacteriológicos, manejo das aves, nutrição e genéticos. De acordo com Cook (2000), os fatores genéticos influenciam consideravelmente o desenvolvimento do esqueleto das aves. Estudos demonstram que existe herdabilidade moderada para problemas ósseos ($h^2=0,4$) (BISHOP et al., 2000). Outro trabalho demonstra a $h^2=0,45$ para a força da tíbia (WHITEHEAD; FLEMING, 2000).

A galinha foi o primeiro animal doméstico a ter seu genoma completo sequenciado, com a finalização do projeto do sequenciamento no ano de 2004. Com isto o progresso na pesquisa molecular cresceu rapidamente, possibilitando elucidar *loci* que controlam características quantitativas (QTLs), detectar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e até mesmo, a partir da transcriptômica, confirmar se determinado gene é ou não expresso em uma célula específica.

Alguns QTLs relacionados com a integridade óssea foram mapeados nos últimos anos. ZHOU et al. (2007) fizeram o mapeamento do genoma da galinha para 12 características ligadas à integridade óssea em duas populações divergentes (aves de corte x aves de postura e aves de corte x Fayoumi). Foram encontradas 56 regiões de QTLs significativas em nível cromossômico, sendo que 20% delas também atingiram nível de significância genômico, estando nos cromossomos: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 24 e Z. Dunn et al. (2007) fizeram o mapeamento de QTLs associados a osteoporose em aves de uma população F2 de White Leghorn, para qualidade óssea, onde foi encontrado um QTL significativo no cromossomo 1 para índice de qualidade óssea e para as características componentes da força de quebra da tíbia e fêmur. Schreiweis, Hester e Moody (2005) detectaram um grande número de QTLs para mineralização e resistência dos ossos em regiões de 12 cromossomos (2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 15, 18, 19, 26 e 27).

Apesar de alguns QTLs relacionados à integridade óssea já terem sido mapeados no genoma da galinha, são raros os estudos de genes candidatos relacionados à integridade óssea em frangos. Bennett, Hester e Spurlock (2006) investigaram as associações de alguns genes candidatos de proteínas, como o receptor de vitamina D (*VDR*), insulina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1*) e osteopontina (*SPP1*), com o crescimento ósseo em população F2. Associações significativas foram observadas entre *VDR* e conteúdo mineral no fêmur às 35 semanas de idade. Apesar desses estudos, ainda não foram identificados marcadores que possam ser utilizados na seleção de animais para a melhoria da estrutura óssea. Dessa forma, é necessário o uso de novas tecnologias para

identificar os possíveis genes envolvidos com este processo e suas mutações causais.

1.1.6 Genes relacionados ao tecido ósseo

Vários genes são reconhecidos como genes candidatos para os problemas ósseos, alguns já encontrados no genoma da galinha, mas muitos identificados somente em humanos ou roedores. Alguns genes estudados estão localizados nos QTLs citados anteriormente, como por exemplo, o gene *SPP1* está localizado no cromossomo 4 estudado por Schreiweis, Hester e Moody (2005). Neste estudo selecionamos 12 genes, dos quais a função biológica da sua proteína está envolvida com o metabolismo dos ossos.

1.1.6.1 Gene da Proteína Morfogenética Óssea tipo 2 (*BMP2*)

O gene *BMP2* está localizado no cromossomo 3 da galinha e no cromossomo 20 de humanos. No genoma da galinha é composto por dois éxons, sendo o primeiro muito pequeno, com poucos pares de bases, e o segundo maior.

A proteína BMP2 tem sido potencialmente associada em múltiplos processos de morfogênese e ao padrão de formação do embrião dos vertebrados, não apenas no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros tecidos e órgãos (LYONS; PELTON; HOGAN, 1990). Isto é evidenciado pela ampla distribuição da expressão do RNA mensageiro do gene *BMP2* em uma variedade de tecidos celulares. Outra evidência de sua importância é que o *knockout* desse gene é letal para o embrião humano (WOZNEY, 1995).

Além de suas funções embrionárias, Lecanda et al. (1998) descreveram que a função mais importante do *BMP2* nos osteoblastos é que o seu produto é responsável pela indução da diferenciação celular para a expressão das proteínas da matriz óssea necessárias à sua regeneração. Outros estudos demonstram que a *BMP2* estimula a osteopontina, osteocalcina, sialoproteína e a fosfatase alcalina, isso ocorreu durante a diferenciação osteogênica *in vitro* (DIEFENDERFER et al., 2003).

Em aves o gene *BMP2* é expresso no tecido dos condrócitos na fase pré-hipertróficas além de apresentar uma nova função de regular a formação de osteoclastos na placa de crescimento durante a ossificação endocondral (USUI et al., 2008).

1.1.6.2 Gene da Osteopontina (*SPP1*)

O gene da osteopontina (*SPP1*) está localizado no cromossomo 4, tanto em humanos como em galinhas, em galinhas o genes está localizado em um *locus* da região de QTLs estudada por Schreiweis, Hester e Moody (2005).

A proteína *SPP1* é uma proteína ácida, glicosilada, fosforilada e altamente relacionado com o metabolismo do cálcio em aves e mamíferos (Brionne et al., 2014), primeiramente encontrada no osso. Entretanto, essa glicoproteína está presente em ampla variedade de tecidos (BROWN et al., 1992) e é expressa no osso, cartilagem, rim, cérebro, tecidos vasculares, gânglios do ouvido interno, células salivar e mamárias, bem como em outros tecidos (SODEK; GANSS; MCKEEL, 2000). Em aves a osteopontina é encontrada em ambos os osso e na casaca do ovo (Hincke et al., 2008)

O *SPP1* está associado com inflamação e reparo de tecido (MURRY et al., 1994) e está ligado ao remodelamento do tecido ósseo (O'REGAN; BERMAN, 2000). Muitos estudos relatam sua importante participação na fisiologia da implantação embrionária (JOHNSON et al., 2003). Outro estudo demonstra que o *SPP1* está envolvido na reabsorção osteoclasto e a formação osteoblasto do osso (ISHIJIMA et al., 2001). Além disso, o *SPP1* também é está envolvido com a calcificação massiva na casca do ovo (MANN, 2007).

1.1.6.3 Gene da Osteoprogenina - OPG (*TNFRSF11B*)

O gene da osteoprogenina (*TNFRSF11B*) está localizado no cromossomo 8 de humanos e no cromossomo 2 de galinhas. A OPG é uma glicoproteína que regula a reabsorção óssea (SIMONET et al., 1997), e *in vivo* e *in vitro* tem-se observado que a OPG inibe o desenvolvimento do osteoclasto. Essa proteína é o membro 11 da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), que atua como inibidor solúvel na maturação e ativação dos osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). OPG age como reguladora de densidade óssea, podendo agir localmente e sistematicamente, regulando a maturação dos osteoclastos (SIMONET et al., 1997).

A proteína do *TNFRSF11B* tem um papel importante na fisiologia pós-natal de camundongos durante a formação óssea e também na regulação da calcificação das artérias (BUCAY et al., 1998). Em aves um SNP do gene foi associado com componentes esqueléticos, como a resistência e o peso da tíbia (FORNARI et al., 2014).

OPG é secretada em diversos órgãos como coração, rim, fígado e baço, além da medula óssea

(Boyce; Xing, 2008). Estudo feito com camundongos relata que as células B são as responsáveis pela maior quantidade de OPG na medula óssea (Li et al., 2007).

1.1.6.4 Gene da Osteonectina (*SPARC*)

O gene da osteonectina ou proteína ácida secretada rica em cisteína é uma glicoproteína multifuncional (ZHOU et al., 2002). O *SPARC*, está localizado no microcromossomo 13 de galinha. A proteína não é colagenosa e possui a capacidade de ligar-se a várias proteínas da matriz extracelular, regulando a ação de fatores de crescimento, alterando o formato da célula através de sua ação anti-adesiva (BRADSHAW; SAGE, 2001).

A proteína osteonectina é expressa em vários estágios de desenvolvimento de tecidos, e é restrita, principalmente, para vertebrados adultos que sofrem com lesão local e submetidos a cicatrização de feridas, desenvolvimento e remodelação (BREKKEN; SAGE, 2001). A glicoproteína codificada pelo gene *SPARC* participa da mineralização óssea, onde é segregada por células como os osteoblastos e fibroblastos (RIBEIRO et al., 2014).

1.1.6.5 Gene da Sialoproteína óssea - BSP ou IBSP (*IBSP*)

A IBSP é conhecida por desempenhar funções biológicas fundamentais no desenvolvimento e mineralização do osso (GANSS; KIM; SODEK, 1999), e é uma proteína não colagenosa (PESESSE et al., 2014). É altamente expressa por osteoblastos, osteoclastos e condrócitos hipertróficos, particularmente nos sítios primários de formação óssea. A proteína codificada pelo

gene *IBSP* é uma das principais proteínas estrutural da matriz óssea, o gene está localizado no cromossoma quatro, tanto de humano como em galinhas.

A falta de *IBSP* altera a composição, quantidade e mineralização da matriz de osteoblastos (MALAVAL et al., 2008). Em outro estudo Bouleftour et al. (2014), demonstrou que camundongos com o *IBSP* silenciado são menores no nascimento do que camundongos sem alterações.

1.1.6.6 Gene da Calbindina (*CALB1*)

O gene *CALB1* está localizado no cromossomo 8 de humanos e no cromossomo 2 de galinhas, codifica a calbindina, uma proteína de ligação de cálcio (Ca^{2+}), estando presente, principalmente, em células neuronais e células do rim de mamíferos, aves e outras espécies (AIRAKSINEN et al., 1997; CHAUDHURY; NAG; WADHWA, 2008). A calbindina é responsável por sequestrar o excesso de Ca^{2+} durante o desenvolvimento da atividade sináptica (CHAUDHURY; NAG; WADHWA, 2008), além disso, há presença da calbindina ativa na via transcelular para a síntese da vitamina D (SOUZA, 2012).

Margolisa et al. (2006) verificaram que a quantidade de calbindina presente nos ossos de camundongos em crescimento é igual em duas populações estudadas. Indicando que a possibilidade de que o aumento do volume ósseo e rigidez podem ser devido a alterações na sinalização intracelular em osteoblastos.

1.1.6.7 Gene do Fator de transcrição relacionado ao gene *runt2* (*RUNX2*)

O gene *RUNX2* está localizado no cromossomo 6 humano e no cromossomo 3 da galinha. O produto do gene *RUNX2* estimula as células mesenquimais para a diferenciação em osteoblastos, mas inibe a sua diferenciação em condrócitos e adipócitos (KOMORI, 2010). O *RUNX2* transcreve o fator de transcrição relacionado ao gene *runt2* que regula a expressão de *Col10A1* em condrócitos hipertróficos e a expressão de *SPP1*, *IBSP*, e *MMP13* em condrócitos hipertróficos terminal (KOMORI, 2010). Durante o processo de diferenciação dos osteoblastos, o *RUNX2* desencadeia a expressão de *COL1A1*, *COL1A2*, *SPP1*, *IBSP* e *Bglap* e mantém a expressão de *SPP1* e *IBSP* em osteoblastos imaturos (KOMORI, 2010).

1.1.6.8 Gene da Calmodulina 2 (*CALM2*)

O gene *CALM2* é um dos genes da família CAM, está localizado no cromossomo 2 de humano e no cromossomo 3 da galinha e codifica a proteína calmodulina 2. Esta é uma proteína de ligação ao Ca^{2+} que realiza diversas funções na regulação intracelular (com a interação ao Ca^{2+}), dependendo de Ca^{2+} , essa ligação da calmodulina com Ca^{2+} modula diferentes proteínas estruturais, de transporte e a atividade das proteínas enzimáticas (NUNOMURA et al., 2000). Porém, somente 5% da calmodulina interage com o Ca^{2+} , o restante fica livre para interagir com outras proteínas (NUNOMURA et al., 2000).

O *CALM2* é expresso no sistema regulador de hormônios das aves incluindo no oviduto de galinhas (STEIN et al., 1983). Mototani et al. (2010) descreveram

que dependendo das condições de expressão do *CALM2* ele pode afetar as propriedades do colágeno podendo ocasionar a osteoartrite em humanos.

1.1.6.9 Gene da cadeia polipeptídica alfa 2 do colágeno tipo I (*COL1A2*)

Em galinhas o gene *COL1A2* está localizado no cromossomo 2 e em humanos no cromossomo 7. O gene da cadeia polipeptídica alfa 2 da proteína colágeno tipo I é mais abundante expresso na formação do colágeno (este é composto por duas cadeias: $\alpha 1$ e $\alpha 2$).

O produto do *COL1A2* é um componente indispensável da matriz óssea, com um importante papel na formação dos ossos (DENG et al., 2003), pois é a proteína extracelular fibrilas que formam os tendões e os ligamentos em aves (BRIONNE et al., 2014). Porém, Carleton et al. (2009) descreveram que *COL1A2* não contribui para a largura do osso cortical em camundongos.

1.1.6.10 Gene do Fator ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ou fator ligante do membro 11 da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral – TNF (*RANKL*)

O gene *RANKL* codifica um fator que é um membro de ligação da superfamília TNF, está localizado no cromossomo 13 humano e no cromossomo 1 de galinhas. Este gene possui sua expressão em ossos trabeculares e em tecidos linfóide e sua expressão ativa a resposta imune (QUINN et al., 1998). Os fatores que estimulam a formação dos osteoclastos induzem a expressão do *RANKL* nas células osteoblasticas

(BOYCE; XING, 2008). A expressão do *RANKL* auxilia a formação dos osteoclastos (YASUDA et al., 2016). Os genes *RANKL* e *TNFRSF11B* são expressos pelo osteoblasto, as proteínas desses dois genes apresentam grande afinidade entre si, quando ligadas o *RANKL* é inativado e não ativa o processo pré-osteoclasto, quando não ocorre a ligação das duas proteínas o *RANKL* se liga ao seu receptor *RANK* e ativa o processo pré-osteoclasto (KEARNS; KHOSLA; KOSTENIUK, 2008).

As células da medula, osteoblastos e células T são suporte para a expressão do *RANKL* (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). O gene *RANKL* é sobre-expresso nos nódulos linfáticos, timo, glândulas mamárias e pulmões que são controlados pelo fator de crescimento, hormônios e citosinas. E com baixo nível de expressão em vários outros tecidos, os quais inclui a medula óssea, que nesse caso é expresso pelos osteoblastos (KEARNS; KHOSLA; KOSTENIUK, 2008).

Segundo Usui et al. (2008), *in vitro*, os condrócitos frequentemente expressam o *RANKL* em quantidades que suportam diretamente a osteoclastogênese, isso ocorre quando células de aves e de camundongos são cultivadas em conjunto. De acordo com Usui et al. (2008) em aves com condrócitos hipertróficos manifestam níveis elevados de expressão do *RANKL*.

1.1.6.11 Gene da proteína membro 1 da família SMAD (*SMAD1*)

O gene *SMAD1* está localizado tanto em humanos como em galinhas no cromossomo 4. Segundo Gruendler et al., (2001), o produto do gene *SMAD1* regula a ativação do receptor da quinase. Este gene também é conhecido como codificador do sinal de

transdução da proteína morfogênica de osso (ABE et al., 2004).

A proteína SMAD1 é a componente principal para a ocorrência da comunicação da proteína morfológica do osso (BMP) com outras vias metabólicas (EIVERS; FUENTEALBA; DE ROBERTIS, 2008), para ativar a SMAD1 é necessário a fosforilação do receptor tipo 1 das BMPs (WANG et al., 2011). A via metabólica da SMAD1 é muito importante na expressão da osteopontina e do *Runx2* (YANG et al., 2009).

Wang et al. (2011) demonstraram que a deleção do gene *SMAD1* em células específicas de condrócito ocasiona um retardo na ossificação do osso do crânio durante a fase pré-natal em camundongos. SMAD1 liga-se a proteínas como HsN3 e ubiquitina, que estão envolvidas com vias de degradação mediada pelo proteossoma (GRUENDLER et al., 2001).

1.1.6.12 Gene do Receptor da Leptina (*LEPR*)

O gene *LEPR* esta localizado no cromossomo 1 de humanos e cromossomo 8 da galinha. A expressão do gene *LEPR* é encontrada na medula óssea (SAMBASIVARAO, 2013). O gene esta presente nas células dos adipócitos e na medula óssea de humanos adultos, e é um dos genes importante para a regeneração dos osteoblastos (ZHOU et al., 2013). Estes osteoblastos podem formar ossículos ósseos que suportam a hematopoese *in vivo*. Alguns SNPs do gene *LEPR* podem interferir na fragilidade dos ossos humanos (YE; LU, 2013). Estudos demonstram que o gene *LEPR* esta associado com características de crescimento de aves de corte (PEIXOTO et al., 2011). Ibelli et al. (2014) demonstraram a associação de um SNP no gene *LEPR* com características de integridade óssea em galinhas.

1.2 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil da expressão de genes relacionados à integridade óssea em diferentes grupos genéticos de aves de corte e postura.

1.2.1 Objetivos Específicos

Coletar dados relacionados à constituição e composição do fêmur e da tíbia visando montar um banco de dados fenotípicos de características relacionadas à integridade óssea de aves de diferentes linhagens.

Quantificar os níveis de expressão de 11 genes associados ao metabolismo ósseo em duas linhagens de postura (CC e CCc) em diversas idades.

Quantificar os níveis de expressão de 10 genes associados ao metabolismo ósseo em duas linhagens de corte (TT e LLc) em diversas idades.

Quantificar a expressão de genes relacionados com a integridade óssea em aves com e sem necrose na cabeça do fêmur e identificar genes diferencialmente expressos entre esses grupos em aves comerciais.

Gerar conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo ósseo.

2 Capítulo II. Influência da seleção genética sobre a expressão de genes relacionados à integridade óssea em linhagens de postura em diferentes idades

Ediane Paludo¹, Jane de Oliveira Peixoto², José Rodrigo Claudio Pandolfi², Letícia Lopes², Carlos André da Veiga Lima-Rosa¹, Mônica Corrêa Ledur²

¹Universidade do Estado de Santa Catarina,
Departamento de Ciência Animal, Lages, SC, Brasil ,

²EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

* monica.ledur@embrapa.br

2.1 RESUMO

O melhoramento genético de aves foi muito intenso nas últimas décadas, sendo que as aves de postura passaram a produzir praticamente três vezes mais ovos do que produziam antes. Contudo, algumas características não acompanharam os ganhos genéticos obtidos para a eficiência produtiva como, por exemplo, a resistência óssea das aves de postura. Este trabalho teve o objetivo de avaliar características de integridade óssea e a expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo ósseo em duas linhagens de aves de postura, uma selecionada e outra controle, em diferentes idades. Para isso foram usadas aves fêmeas de um dia, de 36 semanas, e de 65 semanas de idade, de uma linhagem selecionada (CC) e uma linhagem controle (CCc). Para as características fenotípicas avaliadas, foram encontradas interações entre linhagem e idade ($p < 0,05$) para espessura, flexibilidade e teor de cinza da tíbia e espessura basal da casca do ovo. Para as demais

características fenotípicas foram desdobrado as análises encontrando efeito de linhagem para matéria seca, quantidade de cálcio e quantidade de fósforo do fêmur, densidade do ovo, matéria seca e cinzas da casca do ovo e matéria seca da tíbia e efeito de idade para todas as demais características fenotípicas exceto peso da casca do ovo. Considerando a expressão dos genes estudados, *BMP2*, *CALB1*, *CALM2*, *COL1A2*, *IBSP*, *OPG*, *RANKL*, *RUNX2*, *SMAD1*, *SPARC* e *SPP1*, foi encontrada maior expressão nas aves da linhagem controle na idade de 65 semanas, sendo significativa para maioria dos genes. Dessa forma, foi possível identificar genes diferencialmente expressos devido às mudanças ocasionadas pela seleção para múltiplas características e avançar no conhecimento de alguns fatores genéticos associados à fisiologia do esqueleto em poedeiras em distintas fases da vida produtiva.

Palavras-chave: expressão gênica – linhagem controle – linhagem pura – tíbia

2.2 ABSTRACT

The poultry breeding programs were very intense in the last decades, in which laying hens increase the egg production in almost three times than produced before. However, some bone related traits in laying hens. This work aimed to evaluate bone integrity traits and the expression of genes related to bone metabolism in two laying hens lines, one selected and other control at different ages. For this, female laying hens from a selected line (CC) and a control line (CCc) were collected one day, 36 weeks and 65 weeks of age. For phenotypic traits evaluated interactions between the line and age

was found ($p < 0.05$) in thickness, flexibility and tibia ash content and baseline thickness of the egg shell. For other phenotypic characteristics were deployed analyzes finding line effect for dry matter, calcium and amount of phosphorus in the femur, egg density, dry matter and ash of the dry eggshell and material of the tibia and the effect of age for all other phenotypic characteristics except eggshell weight. Whereas the expression of the genes studied, *BMP2*, *CALB1*, *CALM2*, *COL1A2*, *IBSP*, *OPG*, *RANKL*, *RUNX2*, *SMAD1*, *SPARC* and *SPP1*, we found upregulation of most of the genes in the CCc chickens at 65 weeks of age. In this way, it was possible to identify differentially expressed genes due to changes caused by selection for multiple traits and advance in the knowledge of some genetic factors associated with skeletal physiology in laying hens at different stages of the production life.

Keywords: gene expression - control line - pure breed - tibia

2.3 Introdução

Por meio de intenso melhoramento genético, as empresas de genética avícola têm produzido linhagens com grande eficiência na produção de ovos. Anualmente, são obtidos ganhos genéticos em características como: produção de ovos, peso do ovo, peso corporal, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade e qualidade do ovo. Juntamente com as melhorias para essas características de interesse, características indesejáveis para as aves como a suscetibilidade às doenças e problemas de formação óssea vêm aumentando nas linhagens comerciais.

Na avicultura de postura, a osteoporose é um dos principais problemas relacionados à integridade óssea. Webster (2004) estimou que mais de 80% das poedeiras comerciais apresentam problemas de osteoporose, e destas, mais de 20% sofrem fraturas ósseas, constituindo um dos mais sérios problemas do sistema esquelético nas atuais linhagens de aves de postura comerciais (BUDGEELL e SILVERSIDES 2004; MAZZUCO, 2006). Além disso, o confinamento destes animais em gaiolas sem a realização de exercícios contribui para o alto índice de fraturas ósseas (MAZZUCO, 2006). Estes problemas ósseos além de causar alterações fisiológicas que afetam a produção também comprometem o bem-estar das aves devido ao aumento no desconforto animal.

De acordo com Cook (2000), os fatores genéticos influenciam consideravelmente o desenvolvimento do esqueleto das aves. Todavia, existem poucos artigos a respeito de parâmetros genéticos para características ósseas medidas na tíbia. Existem alguns estudos sobre características ósseas ligadas a densidade mineral e conteúdo mineral da tíbia e úmero (SCHREIWEIS; HESTER; MOODY, 2005; ZHOU et al., 2007; SHIM et al., 2012a), problemas ósseos associados ao rápido crescimento (LILBURN, 1994; THORP; WADDINGTON, 1997), osteoporose em galinhas de postura (BISHOP et al., 2000), e morfologia e força de quebra medidas na tíbia (SHIM et al., 2012b). Bishop et al., (2000) estimaram a herdabilidade desses problemas como moderada ($h^2=0,4$) e Whitehead e Fleming (2000) estimaram uma herdabilidade moderada para a força de quebra da tíbia ($h^2= 0,45$). Apesar da existência desse componente genético, os mecanismos moleculares relacionados ao metabolismo ósseo são pouco conhecidos. Dessa forma, no presente trabalho

objetivou-se avaliar características de integridade óssea e o padrão de expressão de 11 genes candidatos em duas linhagens puras de aves de postura, uma selecionada para múltiplas características e outra sem seleção (controle), em diferentes idades.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Animais experimentais e material biológico

Foram utilizadas linhagens desenvolvidas no programa de melhoramento genético de aves da Embrapa Suínos e Aves, as linhagens CC (selecionada) e CCc (controle). Estas apresentam a mesma base genética originada da raça White Leghorn. A partir de 1989, a linhagem CC foi selecionada para melhorar a produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e um reduzido peso corporal. Já a linhagem CCc é uma linhagem controle que não está sendo selecionada para as múltiplas características. Contudo, essa linhagem é mantida com controle de pedigree a fim de manter a variabilidade genética da linhagem. Informações detalhadas sobre as referidas linhagens podem ser obtidas em Figueiredo et al. (2003).

Foram realizadas coletas em fêmeas das duas linhagens (CC e CCc) em três idades: 1 dia de idade (n=24); 36 semanas de idade (n=30), período de constante produção; 65 semanas de idade (n=30), ao final da produção; sendo metade dos animais de cada idade de cada linhagem. As aves das duas linhagens foram criadas nas mesmas condições experimentais de acordo com o manejo recomendado para aves de postura, com a densidade de 10 aves/m² em piso, não usando bateria para recria, e em gaiola convencional de

aramé. A partir da 16 semanas as aves foram criadas em gaiolas de produção com 1125 cm² com uma ave por gaiola.

As aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical, na Sala de Necropsia do Complexo de Sanidade e Genética Animal – Embrapa Suínos e Aves, seguindo os procedimentos aprovados pelo comitê de ética desta unidade (CEUA 011/2011). Na necropsia, foi mensurado o peso vivo dos animais e observado o escore corporal. Após o sacrifício, foram coletados os ossos do fêmur e tíbia da perna direita para as análises fenotípicas. Já a tíbia da perna esquerda foi dissecada, congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C para a análise de expressão gênica.

2.4.2 Características fenotípicas

2.4.2.1 *Características morfológicas e biomecânicas*

Os ossos tíbia e fêmur da perna direita foram coletados em todas as idades, exceto na idade das 65 semanas, em que não foi possível coletar a tíbia. Os ossos foram pesados em balança de precisão, e o comprimento e a espessura foram mensurados com paquímetro. Em seguida, os ossos foram congelados à -20°C para realização das demais análises fenotípicas.

Para a análise das características biomecânicas (força de quebra e flexibilidade), os ossos foram descongelados a temperatura de 0°C por 48 horas, em seguida a temperatura ambiente por 1 hora. As análises foram realizadas utilizando o equipamento TA – XTPPlus Texture Analyzer (Texture Technologies Corporation), usando a sonda TA-92c (Texture Technologies

Corporation). O local da quebra foi estabelecido à metade da distância entre as duas extremidades do osso, estabelecendo uma medida fixa dos suportes laterais, para cada grupo de osso (fêmur e tíbia) em cada idade da ave. A distância percorrida pela sonda após o toque na amostra foi de 12 mm, com velocidade de teste de 2,00 mm/s, velocidade de pré-teste de 2,00 mm/s e velocidade de pós-teste de 20,00 mm/s. A força peso com que a sonda tocava na amostra, programada no equipamento, foi de 0.0050 Kg.

Os valores obtidos pela análise de resistência da quebra dos ossos foram à força (kg) utilizada pela sonda e a distância (mm) que a sonda percorreu para atingir a quebra. A razão dos valores da força da sonda utilizada para a quebra do osso e a distancia percorrida originou o valor da flexibilidade (kg/mm) de cada osso quebrado.

2.4.2.2 Composição química dos ossos

As seguintes características de composição química dos ossos foram avaliadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas da Embrapa Suínos e Aves: matéria seca (MS), cinzas (CZ), teor de cálcio (Ca), teor de fósforo (P), teor de zinco (Zn) e teor de magnésio (Mg). Após as análises biomecânicas, os fragmentos dos ossos foram submetidos à estufa com temperatura de 105°C por 16 horas, segundo o método 012/VI (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008a). Para determinar o peso das amostras em matéria seca foi submetido o valor do peso da matéria seca multiplicado por 100% e o resultado dividido pelo peso da amostra úmida.

Após a determinação da MS foi feita a determinação do teor de cinzas. As amostras da matéria seca foram colocadas no forno tipo mufla por

aproximadamente seis horas, sendo que a temperatura do mufla foi aumentada gradativamente até à temperatura máxima. Foram usados 350°C por uma hora, 450°C por uma hora, 550°C por uma hora e 600°C por três horas. A quantidade de cinzas foi determinada por análise gravimétrica segundo o método 018/VI (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008a). A quantidade de cinzas presente em cada osso foi determinada em porcentagem em referência à matéria seca dos ossos.

A solubilização ácida das cinzas foi utilizada para a determinação dos minerais, seguindo a metodologia descrita pelo Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2009), nº 38. Para os ossos das aves de um dia de idade não foi possível realizar estas análises, pois não havia quantidade mínima de cinzas necessária por animal para a leitura nos equipamentos.

A determinação do teor de cálcio (Ca), zinco (Zn) e magnésio (Mg) foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, em equipamento da marca VARIAN (ESPECTRA AA 220), seguindo as recomendações do fabricante. A determinação de teor de fósforo (P) foi realizada por espectrofotometria UV (AOAC 986.08), em equipamento da marca VARIAN (CARY 50), seguindo as recomendações do fabricante.

2.4.2.3 Fenótipos medidos no ovo e na casca do ovo

Nos três dias antes da necropsia das aves foram coletados ovos das aves nas idades de 36 e 65 semanas. Algumas aves de 65 semanas não tiveram postura nos três dias consecutivos, mas um ovo no mínimo foi coletado. No momento da coleta foi mensurado o peso do ovo em balança de precisão, e o comprimento com o auxílio de paquímetro.

A densidade do ovo foi estimada pelo método de imersão dos ovos em solução salina. Foi utilizado um score de um a seis correspondentes a 100, 102, 112, 118, 124 e 130 gramas de sal por litro de água, respectivamente. Foram colocados os ovos na ordem crescente dos recipientes identificados, à temperatura ambiente, até os ovos flutuarem na solução (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008b).

Em seguida, descartou-se a gema e a clara do ovo, ficando somente com a casca de cada ovo, que foram secadas por 48h a temperatura ambiente e mensuradas para peso em balança de precisão, e espessura apical, espessura equatorial e espessura basal com auxílio de um micrometro digital. Para as análises de matéria seca, cinzas, cálcio e fósforo foram utilizadas as mesmas metodologias citadas anteriormente para os ossos.

2.4.3 *Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA*

Foi utilizado 100 mg de tecido do osso da tíbia congelada no freezer -80°C, macerado com auxílio de nitrogênio líquido e misturado em 1 ml de reagente *Trizol*® (*Invitrogen*) para isolar o RNA total. Depois de homogeneizado e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente, foi acrescentado 200 µL de clorofórmio e agitado vigorosamente. Logo após, as amostras foram centrifugadas em 12000 x g por 15 minutos em temperatura de 4°C para separar as fases. O RNA presente na fase aquosa foi coletado e precipitado com 500 uL de isopropanol 100%, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado em 12000 x g por 10 minutos em temperatura de 4°C. O resíduo formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%,

centrifugado em 7500 x g por 5 minutos em temperatura de 4°C. Para finalizar, o resíduo formado foi diluído com água tratada com DEPC.

O RNA extraído foi quantificado usando no espectrofotômetro *Nanodrop*, considerando a razão do OD260:OD280 maior que 1.9, e a integridade foi confirmada em gel de agarose 1,5%. Para a síntese de cDNA foi utilizado 3 µg de RNA total usando o kit *Super Script II First-Strand Synthesis SuperMix®* (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

2.4.4 Análise de RT PCR em Tempo Real

Na expressão relativa foram usados 11 genes candidatos: *SPP1* (codifica a proteína osteopontina), *CALB1* (calbindina), *TNFRSF11B* (osteoprotegerina), *SPARC* (osteonectina), *CALM2* (calmodulina 2), *IBSP* (sialoproteína óssea), *COL1A2* (cadeia polipeptídica alfa 2 do colágeno tipo I), *BMP2* (proteína morfogenética óssea 2), *RANKL* (fator ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa-B), *SMAD1* (proteína membro 1 da família SMAD), *RUNX2* (fator de transcrição relacionada ao fator Runt 2). As sequências foram obtidas a partir do genoma da galinha (*Gallus gallus* v. 4.0) depositada no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os *primers* foram desenhados na junção éxon-éxon usando o programa *primer-BLAST* (YE et al., 2012) (Tabela 1). Além disso, os *primer* foram avaliados quanto a presença de estrutura secundária pelo software *Netprimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Para todos os genes estudados, a eficiência de amplificação foi obtida usando o *LinRegPCR* (Ruijter et al., 2009) e a especificidade foi avaliada pela análise da curva de dissociação.

A reação de RT-PCR em tempo real teve volume final de 15 µL, contendo 1x de *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*® (2x) (*ThermoFisher Scientific*), 0,133 µL de cada primer e 20 ng de cDNA. A análise foi realizada no *ABI Prism 7500 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*) usando corante de fluorescência *SYBR Green*. Foi utilizado o gene *RPL30* como referência para normalizar o ciclo limiar (Ct) de cada amostra. A partir dos valores obtidos pelas duplicatas das amostras para cada gene, com a eficiência do primer entre 90 a 100% (Tabela 1), foi gerada a média para todas as amostras e com esta foi calculado o $2^{-(DDCT)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. *Primers* usados na análise de qPCR

Gene	Primer(5'-3')	Bp	Ensembl ID	Numero de acesso	Eficiência do primer
<i>TNFRSF11B</i>	F:5'-ACGCTGTGCTCTTGGACAT-3'	193	ENSGALG00000016114	NM_001033641.1	0.93
	R:5'-CAGCGTAGTACTGGTCTGGG-3'				
<i>RUNX2</i>	F:5'-GATTACAGACCCAGGCAGG-3'	75	ENSGALG00000026484	NM_204128.1	0.92
	R:5'-TGGCTCAAGTAGGACGGGTA-3'				
<i>CALB1</i>	F:5'-GGCAGGCTTGGACTTAACAC-3'	143	ENSGALG00000015914	NM_205513.1	0.93
	R:5'-GCTGCTGGCACCTAAAGAAC-3'				
<i>SMAD1</i>	F:5'-GTTTTGTAAAGGGTTGGGAGC-3'	174	ENSGALG00000009977	NM_001201455.1	0.94
	R:5'-AATGCAGGAGCTTGGGACCTTA-3'				
<i>RPL30</i>	F:5'-ATGATTCGGCAAGGCAAGC-3'	171	ENSGALT00000013370	NM_001007967.1	0.9
	R:5'-GTCAGAGTCACCTGGGTCAA-3'				
<i>SPP1</i>	F:5'-GAAAAATACGACCCAGGAG-3'	105	ENSGALG00000010926	NM_204535.4	0.92
	R:5'-TGAAGCCAGGTCATTCTGTG-3'				
<i>SPARC</i>	F:5'-GTATGAGCGCGATGAGGACA-3'	214	ENSGALG00000004184	NM_204410.1	0.93
	R:5'-GTGGGACAGGTACCCATCAA-3'				
<i>CALM2</i>	F:5'-CCACCATGGCTGATCAACTG-3'	191	ENSGALG00000010023	NM_205005.1	0.93
	R:5'-GCCATTGCCATCAGCGCTCA-3'				
<i>IBSP</i>	F:5'-CATCGCTACAAGGGCAGTGA-3'	100	ENSGALG00000010928	NM_205162.1	0.95
	R:5'-CTGTGCCTGAGTACCTGC-3'				
<i>COL1A2</i>	F:5'-TAAGGGTGAAATCGGACCTG-3'	88	ENSGALG00000009641	NM_001079714.2	0.93
	R:5'-ACCACTGGAACCAAGGAGTC-3'				
<i>BMP2</i>	F:5'-AGCTTCCACCAAGAAAGT-3'	172	ENSGALG00000008830	NM_204358.1	0.93
	R:5'-GGTAGCTGCTGTTGCTCTCA-3'				
<i>RANKL/TNFSF11</i>	F:5'-GACACGCCCTTTGAAAATCAGG-3'	100	ENSGALG000000026163	NM_001083361.1	0.94
	R:5'-TACGCTGGACTTCCTCTGC-3'				

Bp = Tamanho de amplificação

2.4.5 Análises Estatísticas

Para a análise de estatística foi utilizada a metodologia estatística utilizada foi a Análise de Variância, através do procedimento MIXED do SAS™ (2012), testando-se os efeitos fixos de idade, linhagem e a interação entre eles. Através do seguinte modelo linear:

$$y = \mu + L + i + (L * i) + e \text{ onde:}$$

y = representa o valor das características;

μ = media geral da característica;

L = efeito fixo linhagem;

i = efeito fixo idade;

e = erro aleatório.

As médias entre idades foram comparadas usando a diferença mínima significativa de Fisher (opção DIFF do comando LSMEANS).

2.5 Resultados

Por meio da análise estatística de variância observamos que diversos valores de expressão dos genes apresentam interação entre idade e linhagem ($p < 0,05$), alguns dos genes e as características fenotípicas apresentam somente efeito de idade e linhagem separadamente (Tabela 2).

2.5.1 Peso vivo

Para a característica peso vivo obtivemos somente efeito de idade, não apresentando efeito de linhagem e interação entre linhagem e idade. O efeito de idade foi significativo ($p < 0,0001$), com as médias do peso vivo de 39,59g, 1701,63g e 1906,10g para as idades de 1 dias, 36 e 65 semanas, respectivamente.

Tabela 2. Níveis descritivos de probabilidade do teste F a análise de variância para as variáveis avaliadas

Variável	Pr > F		
	Idade	Linhagem	Idade× Linhagem
Peso vivo	<0,0001	0,8539	0,9873
Comprimento Fêmur	<0,0001	0,1919	0,6917
Espessura Fêmur	<0,0001	0,6662	0,0896
Peso Fêmur	<0,0001	0,9586	0,5263
Matéria Seca Fêmur	<0,0001	0,0348	0,0924
Força de quebra Fêmur	<0,0001	0,0737	0,4522
Flexibilidade Fêmur	<0,0001	0,0862	0,1359
Cinza Fêmur	<0,0001	0,1807	0,0818
Comprimento Tíbia	<0,0001	0,7718	0,8719
Espessura Tíbia	<0,0001	0,0219	0,0417
Peso Tíbia	<0,0001	0,1837	0,2080
Matéria Seca Tíbia	<0,0001	0,0290	0,2742
Força de quebra Tíbia	<0,0001	0,2118	0,1696
Flexibilidade Tíbia	<0,0001	0,0319	0,0241
Cinza Tíbia	<0,0001	0,0003	0,0287
Cálcio Fêmur	<0,0001	0,0349	0,1927
Magnésio Fêmur	<0,0001	0,1661	0,1843
Fósforo Fêmur	<0,0001	0,0020	0,2971
Zinco Fêmur	<0,0001	0,5996	0,9298
Peso ovo	<0,0001	0,4040	0,8454
Comprimento ovo	0,0002	0,2979	0,1763

Continuação Tabela 2

Variável	Pr > F		
	Idade	Linhagem	Idade× Linhagem
Densidade ovo	<0,0001	0,0012	0,9089
Peso da casca do ovo	0,3630	0,4161	0,2679
Espessura equatorial da casca do ovo	<0,0001	0,5081	0,5009
Espessura apical da casca do ovo	<0,0001	0,5335	0,4756
Espessura basal da casa do ovo	<0,0001	0,3013	0,0358
Matéria seca da casca do ovo	0,1053	<0,0001	0,3213
Cálcio da casca do ovo	0,0106	0,7679	0,1653
Fósforo da casca do ovo	0,0432	0,1784	0,8215
Cinza da casca do ovo	0,2421	0,0001	0,0963
Expressão <i>BMP2</i>	0,0092	0,4071	0,1894
Expressão <i>CALB1</i>	0,0031	0,5924	0,8163
Expressão <i>CALM2</i>	0,7511	0,0076	0,0540
Expressão <i>COL1A2</i>	<0,0001	0,6915	0,0989
Expressão <i>IBSP</i>	<0,0001	0,3342	0,0458
Expressão <i>OPG</i>	0,8179	0,1450	0,3261
Expressão <i>RANKL</i>	0,0007	0,0414	0,0004
Expressão <i>RUNX2</i>	0,0002	0,0218	0,0010
Expressão <i>SMAD1</i>	0,2478	0,0668	0,1917
Expressão <i>SPARC</i>	0,0025	0,0088	0,0513
Expressão <i>SPP1</i>	0,0519	0,1458	<0,0001

2.5.2 Características morfométricas e biomecânicas dos ossos

As variáveis de comprimento, espessura, peso, matéria seca, força de quebra, flexibilidade e cinzas do fêmur não apresentaram interação entre linhagem e idade. Porém, a característica de matéria seca do fêmur apresentou diferença significativa entre as linhagens ($p < 0,05$). As demais características apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) entre as idades (Tabela 3), conforme esperado por serem características de crescimento.

Tabela 3. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis avaliadas, por idade

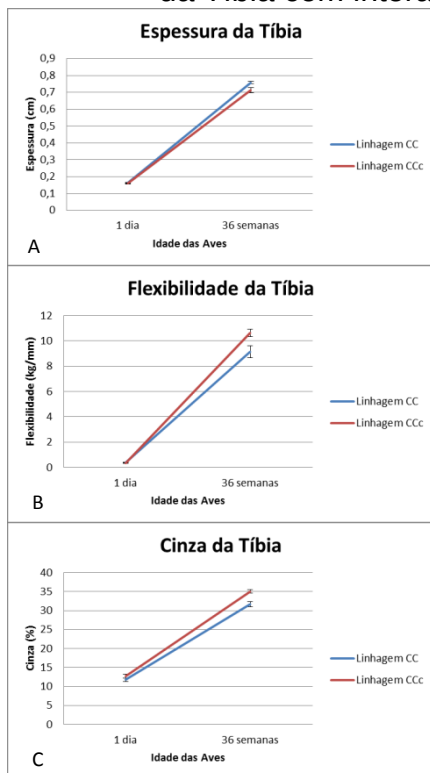
Variável	Idade		
	1 dia	36 semanas	65 semanas
Comprimento Fêmur	2,240±0,021b	8,108±0,038a	8,128±0,057a
Espessura Fêmur	0,158±0,002b	0,734±0,009a	0,742±0,008a
Peso Fêmur	0,156±0,005b	7,620±0,145a	7,411±0,157a
Matéria Seca Fêmur	32,62±0,42c	62,77±0,69a	60,80±0,81b
Força Fêmur	0,869±0,023b	24,28±0,93a	25,27±1,13a
Flexibilidade Fêmur	0,578±0,031b	13,47±0,52a	13,80±0,55a
Cinza Fêmur	9,884±0,267c	33,09±0,62b	51,98±0,77a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste *t-Student* ($p \leq 0,05$).

As variáveis espessura, flexibilidade e quantidade de cinza da tíbia apresentaram interação entre idade e linhagem (Figuras 1A, 1B e 1C). Já a matéria seca da tíbia apresentou efeito de linhagem e idade. As demais

variáveis, como comprimento, peso, força de quebra da tíbia apresentaram somente efeito de idade (Tabela 4). O efeito de idade já era esperado por estar relacionado ao crescimento da ave.

Figura 1. Medidas de Espessura, Flexibilidade e Cinza da Tíbia com interação entre idade e linhagem



A) Espessura da Tíbia (cm); B) Flexibilidade da Tíbia (kg/mm); C) Cinza da Tíbia (%).

Tabela 4. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis avaliadas, por linhagem e idade

Variável	Linhagem	
	CC	CCc
Matéria Seca Tíbia	55,45±3,61	56,85±3,72
Variável	Idade	
	1 dia	36 semanas
Comprimento Tíbia	3,06±0,04	11,71±0,04
Espessura Tíbia	0,161±0,002	0,736±0,009
Peso Tíbia	0,216±0,006	9,08± 0,16
Matéria Seca Tíbia	35,34±0,51	72,12±0,74
Força de Quebra Tíbia	0,711±0,017	21,36±0,66
Flexibilidade Tíbia	0,356±0,019	9,88±0,31
Cinza Tíbia	12,29±0,34	33,33±0,52

2.5.2.1 Características de composição química do osso

A composição química foi avaliada somente no osso do fêmur de 36 semanas e 65 semanas, uma vez que havia pouca quantidade de cinza dos ossos das aves de 1 dia de idade, e não foi possível coletar as tíbia na idade de 65 semanas.

Para a quantidade de cálcio e de fósforo do fêmur obtivemos diferença significativa com o $p < 0,05$, para os efeitos de linhagem e idade, já para a quantidade de magnésio e zinco do fêmur teve somente diferença significativa com $p < 0,05$, para o efeito de idade (Tabela 5).

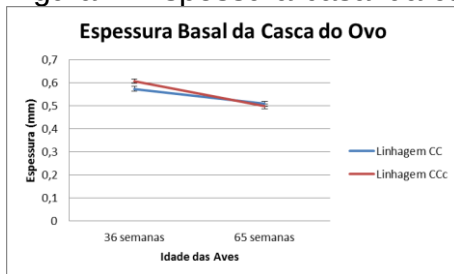
Tabela 5. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis avaliadas no fêmur, por linhagem e idade

Variável	Linhagem	
	CC	CCc
Cálcio Fêmur	299239,7±15044	293231,2±13710
Fósforo Fêmur	137499,7±6678,2	130957,5±6220,4
Variável	Idade	
	36 semanas	65 semanas
Cálcio Fêmur	372620,8±2253,2	222296,2±3471,5
Magnésio Fêmur	6012,61±57,23	3577,35±68,38
Fósforo Fêmur	167911,9±1440,5	101559,0±2117,8
Zinco Fêmur	464,25±5,06	304,34±8,23

2.5.3 Fenótipos medidos no ovo e na casca do ovo

A espessura basal da casca do ovo foi a única variável do ovo e da casca na qual encontramos interação entre idade e linhagem. A diferença entre as duas linhagens ocorreu nas medidas das aves de 36 semanas, com a espessura maior para a linhagem CCc e depois se igualando a linhagem CC nas 65 semanas (Figura 2).

Figura 2. Espessura basal da casca do ovo



Para as demais variáveis medidas no ovo e na casca, foi encontrado efeito ($p < 0,05$) de linhagem e idade. Para a matéria seca e cinza da casca do ovo houve somente efeito de linhagem e para peso e comprimento do ovo, espessura equatorial, espessura apical, quantidade de cálcio e fósforo da casca do ovo houve efeito de idade (Tabela 6). Já para o peso da casca, não houve interação entre idade e linhagem nem efeito fixo de linhagem e de idade.

Tabela 6. Médias, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para as variáveis de ovo e casca de ovo avaliadas, por linhagem e idade

Variável	Linhagem	
	CC	CCc
Densidade do ovo	3,19±0,29	4,54±0,38
Matéria seca da casca do ovo	98,69±0,03	98,87±0,03
Cinza da casca do ovo	92,52±0,35	94,10±0,17
Variável	Idade	
	36 semanas	65 semanas
Esp. equatorial da casca do ovo	0,551±0,004	0,483±0,007
Esp. Apical da casca do ovo	0,596±0,006	0,510±0,008
Esp. Basal da casca do ovo	0,590±0,007	0,504±0,007
Peso do ovo	55,12±1,06	62,65±0,84
Comprimento do ovo	132,79±0,68	136,73±0,73
Densidade do ovo	4,93±0,27	2,50±0,26
Cálcio da casca do ovo	359527,8±1170,2	354740,1±1456,1
Fósforo da casca do ovo	1181,76±38,43	1063,97±45,67

Esp. = espessura

2.5.4 Expressão gênica na tíbia

Na análise da expressão dos genes, houve interação entre linhagem e idade para seis dos 11 genes estudados, os quais são *CALM2*, *IBSP*, *RANKL*, *RUNX2*, *SPARC* e *SPP1*. Os genes *BMP2*, *CALB1* e *COL1A2* apresentaram efeito somente de idade. A maioria dos genes avaliados apresentou maior expressão na linhagem CCc em relação à linhagem CC, especialmente nas aves de 65 semanas de idade.

Na expressão do gene *CALM2* observamos interação entre idade e linhagem ($p=0,054$), além da diferença significativa ($p<0,05$) entre as linhagens nas idades de 1 dia e 65 semanas, com maior expressão do gene na linhagem CCc (Figura 6A). Esta interação apresentou um efeito polinomial quadrático.

As expressões dos genes *IBSP* (Figura 3B), *RANKL* (Figura 3C), *SPP1* (Figura 3D), *RUNX2* (Figura 3E) e *SPARC* (Figura 3F), apresentaram interação entre idade e linhagem com $p<0,05$ para o gene *IBSP*, $p<0,01$ para os genes *RANKL*, *SPP1* e *RUNX2*, e $p=0,051$ para o gene *SPARC*. Os cinco genes apresentaram aumento da expressão nas aves de 65 semanas da linhagem CCc, se diferenciando das aves CC, as quais tiveram expressão linear dos genes. Com isso, genes apresentaram diferença significativa de expressão entre linhagens nas aves de 65 semanas ($p<0,05$), nas outras duas idades não houve diferença de expressão entre as linhagens. Quando observado o efeito polinomial da expressão desses cinco genes encontramos um efeito linear.

Os genes *BMP2*, *CALB1* e *COL1A2* não apresentaram interações entre linhagem e idade. Somente apresentaram diferenças significativas ($p<0,01$) quando comparado entre idades. A expressão dos genes foi maior nas aves de um dia de idade, na idade de 36 semanas houve um decréscimo de 2 vezes para o gene *BMP2*, cerca de sete vezes para o gene *CALB1* e 12 vezes para o gene *COL1A2*. Na idade de 65 semanas, a expressão dos genes aumentou novamente, mas apresentando valores inferiores a expressão dos genes encontrada ao primeiro dia de idade das aves (Tabela 7).

Para a expressão dos genes *TNFRSF11B* e *SMAD1*, não foi encontrada interação significativa ($p<0,05$) entre linhagem e idade, e também não foram

encontradas diferenças significativas entre as idades e entre as linhagens (dados não apresentados).

Figura 3. Expressão dos genes *CALM2* (A), *IBSP* (B), *RANKL* (C), *SPP1* (D), *RUNX2* (E) e *SPARC* (F) na tíbia de aves de postura em diferentes idades

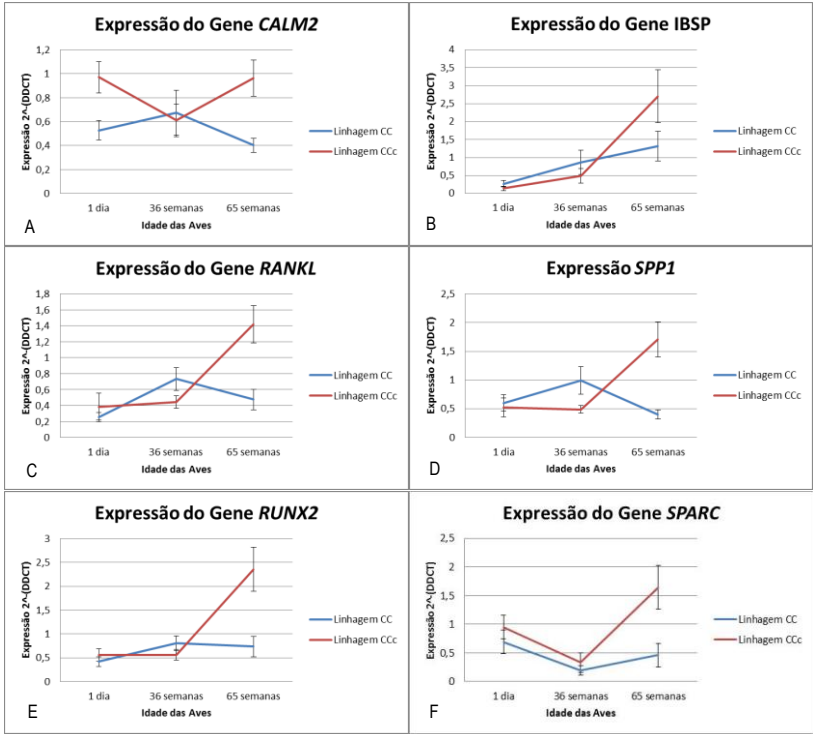


Tabela 7. Expressão dos genes *BMP2*, *CALB1* e *COL1A2* na tíbia de aves de postura em diferentes idades

Variável	Idade		
	1 dia	36 semanas	65 semanas
<i>BMP2</i>	0,748±0,150a	0,324±0,078b	0,366±0,076b
<i>CALB1</i>	0,310±0,053a	0,046±0,008b	0,112±0,027b
<i>COL1A2</i>	0,824±0,158a	0,070±0,016c	0,436±0,122b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste *t-Student* ($p \leq 0,05$).

2.6 Discussão

O progresso genético levou ao aumento na produção de ovos, conformando o tamanho das aves para melhor gasto de energia e maior produção e qualidade de ovos. Contudo, a eficiência na produção de ovos está correlacionada com características indesejáveis como o aumento de problemas metabólicos, redução da resposta vacinal e resistência à doenças infecciosas, além do aumento da incidência de osteoporose e problemas na qualidade da casca do ovo das poedeiras (WHITEHEAD, 2004). Dessa forma, nesse estudo buscou-se investigar a influência da seleção genética sobre a expressão de genes relacionados à integridade óssea em duas linhagens de postura, sendo uma com 17 gerações de seleção para múltiplas características e uma linhagem controle.

Foram mensurados fenótipos relacionados à integridade óssea a fim de se caracterizar esse material genético e demonstrar a existência de variabilidade genética para essas características nas linhagens estudadas. De acordo com resultados, diferenças entre os grupos genéticos foram evidenciadas para

características como matéria seca do fêmur, espessura da tíbia, matéria seca da tíbia, flexibilidade da tíbia, cinza da tíbia, cálcio do fêmur, fósforo do fêmur, densidade do ovo e matéria seca e cinza da casca do ovo. Objetivando-se gerar conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo ósseo, os níveis de expressão de 11 genes candidatos funcionais associados ao metabolismo ósseo foram quantificados nas duas linhagens de postura. Observou-se considerável variação de expressão dos genes devido ao efeito da seleção praticada nessas linhagens, sobretudo na fase final de postura das aves. No total de 11 genes avaliados, seis apresentaram interação significativa entre linhagem e idade, onde a linhagem CCc apresentou genes mais expressos do que a linhagem CC nas aves de 65 semanas (*CALM2*, *IBSP*, *RUNX2*, *RANKL*, *SPP1* e *SPARC*).

As linhagens de aves que foram estudadas neste trabalho vêm sendo monitoradas e controladas a partir de 1989. No nosso trabalho, avaliamos aves da 17ª geração, e encontramos valores semelhante ao de Figueiredo et al. (2000), o qual avaliou aves da quarta geração de seleção comparadas com aves controle na 16 semanas e encontraram médias de 1158g e 1360g, para linhagem CC e CCc, respectivamente. As aves CC da mesma geração nas 80 semanas apresentaram media de peso vivo de 1730 g. A diferença de valores obtidos entre as linhagens poderia ser devido à diferença do peso do ovo embrionado que originou as mesmas, entretanto não há registro do peso de ovos embrionados antes do nascimento destas aves tão pouco o ciclo de postura em que os ovos foram colocados.

Os valores semelhantes encontrados do peso vivo das aves podem estar influenciando a espessura e comprimento de fêmur e tíbia, os valores não diferiram

entre as duas linhagens para as determinadas idades. Somente a característica da espessura da tíbia teve diferença significativa entre linhagens, para as aves de 36 semanas, sendo maiores na linhagem CC. Podemos considerar que os ossos das aves de 36 semanas já estão com crescimento completo, pois no trabalho de Rath et al. (2000), peso, comprimento e diâmetro da tíbia atingiu tamanho máximo na 25ª semana de idade.

Devido ao momento do ciclo da formação da casca do ovo, o volume total do osso medular não altera, o que altera é a quantidade de cálcio do osso medular que é substituído por uma matriz orgânica com pouca quantidade de cálcio, ou seja, a percentagem de osteoclastos aumenta durante o período ativo da postura da galinha (VAN DE VELDE et al., 1984).

A força utilizada para a quebra dos ossos é dependente do tamanho dos ossos, a qual não diferenciou entre as linhagens, mas a distância em que a sonda percorreu o osso e a razão das duas, que resulta na flexibilidade, o fêmur e a tíbia apresentaram diferença de flexibilidade entre as idades. Segundo Rath et al. (2000), a resistência à quebra e o conteúdo mineral atingiram o máximo nas 35 semanas de idade, em aves de postura, pois os ossos medulares são essenciais na formação da casca do ovo.

Para o tamanho do ovo em que as aves estudadas foram selecionadas, Ledur et al. (1993), observaram medidas de aves CC de 36 semanas de idade, em que o peso do ovo era de 54,8g. Para aves de 70 semanas de idade foi observada a média do peso do ovo de 55g, para a linhagem CC e para a linhagem CCc (FIGUEIREDO et al., 2000). O peso médio do ovo foi de 57,52g no primeiro ciclo e 64,27g no segundo ciclo de postura para a linhagem CCc. Já a linhagem CC teve o peso médio do ovo de 57,18g no primeiro ciclo e

63,25g para o segundo ciclo de postura (SCHMIDT et al., 2004). Rosa (2015) encontrou 58,33g para a média do peso do ovo das aves de 36 semanas de idade selecionadas. Estes resultados de peso do ovo, mesmo com poucos ovos avaliados, se encontraram na média dos trabalhos já realizados.

A densidade dos ovos encontrada nesse trabalho diferiu entre as linhagens, os ovos da linhagem CCc apresentaram densidade maior que os ovos da linhagem CC. Valores coerentes com os apresentados por Rosa (2015), em que a densidade dos ovos postos por aves de 36 semanas foi de 4,32 kg/m³. A densidade pode estar relacionada com a espessura da casca do ovo. Neste estudo, observamos medidas de espessura maiores do que o apresentado por Ledur et al. (1993), que relataram que a espessura da casca do ovo de aves da linhagem CC de 36 semanas de idade era de 0,35mm.

A composição da casca do ovo é muito bem ordenada e aproximadamente, 96% composta por minerais (REZENDE; ROCHA, 2013). Brionne et al. (2014) descreveram que a composição é 95% de carbonato de cálcio e 3,5% de macromoléculas orgânicas. A formação da casca do ovo depende de diversos fatores fisiológicos e adaptações uterinas, este processo é chamado de biomineralização controlada, e ocorre em vários organismos (BRIONNE et al., 2014). Outro fator importante que devemos relacionar a todos os caracteres fenotípicos dos ovos é a quantidade de ovos colocados pelas aves, nem todas as aves colocaram a mesma quantidade de ovos. Isso podendo mascarar dados como a espessura do ovo das aves que colocaram menos quantidade de ovos que, possivelmente, seja maior, sendo que os dados foram

tratados por média de todos os ovos de cada ave da linhagem.

Já a composição óssea é diferenciada, é formada pela matriz orgânica, matriz mineral e água, a parte orgânica é formada principalmente pelo colágeno que contribui na resistência ajustando a orientação da matriz mineral (RIGGS; LANYON; BOYDE, 1993). Isso explica os valores elevados de matéria seca e porcentagem de cinzas encontrados nas cascas dos ovos e não encontrado nos ossos. As diferenças nos teores de cálcio, magnésio, fósforo e zinco encontrados nos ossos das duas idades avaliadas, podem estar relacionadas à idade das aves, pois os ossos têm maior quantidade de funções metabólicas, sofrendo remodelações contínuas na quantidade de cálcio durante o ciclo de deposição de ovos (RATH et al., 2000).

Os teores de matéria seca e cinzas e a flexibilidade dos ossos fêmur e tíbia foram maiores nas aves CCc quando comparadas com as aves CC. Além disso, para o fêmur, o cálcio e o fósforo também apresentaram maiores teores na linhagem CCc.

No estudo de expressão gênica, os 11 genes foram escolhidos por serem candidatos funcionais relacionados ao metabolismo ósseo. Esses genes estão relacionados a diversos processos biológicos como diferenciação de osteoblastos, remodelamento do tecido ósseo, ossificação entre outros. A quantificação relativa da expressão desses genes candidatos na tíbia foi utilizada como indicador biológico para se inferir sobre a contribuição dos fatores idade e grupo genético sobre a variação normal da integridade óssea da tíbia.

De acordo com os resultados, quase todos os genes apresentaram expressão diferencial entre as linhagens CC e CCc nas diferentes idades testadas. Os genes *CALM2*, *IBSP*, *RANKL*, *RUNX2*, *SPARC* e *SPP1*

apresentaram interação entre linhagem e idade, os genes *CALB1*, *BMP2* e *COL1A2* tiveram somente efeito de idade. Nas interações entre idade e linhagem que encontramos da expressão dos genes observamos que o gene *CALM2* foi mais expresso na linhagem CCc nas aves de 1 dia e 65 semanas de idade, os genes *RANKL* e *SPP1* apresentaram maior expressão nas aves de 36 semanas da linhagem CC e nas aves de 65 semanas nas aves CCc, já nos demais genes (*IBSP*, *SPARC* e *RUNX2*) foi observado somente diferença de expressão dos genes nas aves de 65 semanas sendo mais expressos os genes nas aves CCc. Observa-se que estes genes apresentam-se regulados negativamente nas aves CC, as quais vêm sendo selecionadas para eficiência produtiva.

A idade de 65 semanas está relacionada ao fim do ciclo de postura em que a condição de fragilidade óssea é geralmente observada. Mazzuco (2006) descreve algumas alterações fisiológicas no metabolismo ósseo de poedeiras comerciais nessa fase. Observa-se a redução na mineralização acompanhada do aumento na reabsorção óssea, que são os primeiros sinais da incoerência fisiológico que leva a lenta perda de osso estrutural e conseqüentemente, eleva a incidência de fraturas. Além da redução na mineralização, também se observa mudanças na estrutura do colágeno no ósseo. A perda na integridade óssea associada à idade ocorre em devido à redução na produção de osteoblastos, as células responsáveis pela deposição da matriz óssea e também à perda na capacidade de absorção da Vitamina D pelos intestinos e ossos. Em função da idade, o declínio no nível de estrógeno circulante também é observado e contribui com a menor mineralização do esqueleto devido à maior reabsorção óssea. Sabe-se que, além da função na

reprodução, o estrógeno desempenha importante papel no esqueleto da fêmea em humanos (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994; KHOSLA, 2010) e também em poedeiras (HANSEN et al., 2003).

Em um estudo sobre a relação entre estrógeno e metabolismo do cálcio ao longo do ciclo produtivo de poedeiras, Hansen et al. (2003) confirmaram a redução dramática na produção do estrógeno em aves com 70 semanas de postura comparadas com aves no pico de produção (29 semanas). Savegnago et al. (2012) apresentaram um estudo sobre a curva de produção de ovos dessas duas linhagens durante 54 semanas de postura. De acordo com esses dados, o pico de postura nas duas linhagens é bem semelhante, ocorrendo entre a 22^a a 26^a. No nosso estudo, as linhagens foram avaliadas nas idades de 36 e 65 semanas, nas quais as aves encontram-se com elevada eficiência de produção e já em fase final de produção, respectivamente.

Provavelmente, a expressão diferencial dos genes observada seja explicada pela influencia dos fatores fisiológicos associados à idade sobre cada um dos genes como, por exemplo, a redução do estrógeno. Sabe-se que o hormônio sexual feminino estrógeno estimula amplamente a expressão do gene *TNFRSF11B* nos osteoblastos em humanos (HOFBAUER et al., 1999). Já o gene da osteopontina (*SPP1*) é regulado por hormônios como estrógeno e progesterona, e vitamina D3, citocinas e fatores de crescimento (NODA et al., 1988; CRAIG; DENHARDT, 1991).

Os genes *SPP1*, *SPARC*, *SMAD1*, *RANKL*, *RUNX2* e *TNFRSF11B* estão envolvidos com a remodelação óssea. O *SPP1* é expresso em todos os tecidos rígidos (HINCKE et al., 2008). O *SPARC* está associado com a remodelação, reparo, renovação celular e início do processo de mineralização óssea (RIBEIRO et

al., 2014). Wang et al. (2011) demonstraram que a falta de *SMAD1* atrasa a ossificação. O gene *RUNX2* é essencial para a diferenciação dos osteoblastos (LIU; LEE, 2013). A ausência do *RANKL* resulta no desenvolvimento da osteoporose, devido à insuficiência de osteoclastos (BOYCE et al., 2003). Já o *TNFRSF11B*, dependendo da quantidade, inibe a diferenciação dos osteoclastos (SIMONET et al., 1997). Paludo et al. (2014) observaram que em frangos comerciais a regulação negativa do gene *RUNX2* pode contribuir para a incidência da anomalia genética conhecida como condronecrose bacteriana com osteomelite (BCO).

Além desses, o gene *CALM2* é um determinante genético para a osteoartrite (MOTOTANI et al., 2010), e em nosso estudo foi identificada maior expressão nas aves da linhagem controle de 1 dia e de 65 semanas de idade quando comparadas com as aves da linhagem selecionada. Estes achados corroboram com a hipótese de que as aves da linhagem controle têm uma regeneração óssea mais expressiva, devido à diferenciação de expressão dos genes.

As expressões que ocorreram em maior quantidade na linhagem melhorada quando comparada com a linhagem controle foram dos genes *SPP1* e *RANKL* nas aves de 36 semanas. Porém, na idade seguinte, a expressão destes genes foi reprimida e não apresentando diferenças significativas entre as linhagens. O gene *IBSP*, que teve diferença de expressão nas aves de 65 semanas de idade, é importante na diferenciação de osteoblastos, na mineralização da matriz óssea e na metástase tumoral (SHIMIZU-SASAKI et al., 2001). Os genes *SPP1* e *COL1A2* estão associados com inflamação, reparo e remodelação de tecido ósseo (MURRY, 1994, O'REGAN

e BERMAN, 2000), e são importantes na formação dos ossos e da arquitetura óssea (PHILLIPS et al., 2000).

A linhagem controle expressa em maior quantidade genes importantes para a integridade óssea, quando comparada com a linhagem selecionada. Em especial, a expressão dos genes se destaca ao final da vida produtiva, momento em que normalmente ocorrem mais lesões ósseas. Budgell and Silversides (2004) avaliaram a quantidade de ossos quebrados em três diferentes idades, encontrando uma frequência de quebra da tíbia de 5% em aves com idade no final da produção de ovos.

2.7 Conclusão

A comparação da expressão dos genes candidatos na tíbia de aves das linhagens melhorada e controle permitiu identificar genes diferencialmente expressos devido às mudanças ocasionadas pela seleção para múltiplas características. Dessa forma, foi possível avançar no conhecimento de alguns fatores genéticos associados à fisiologia do esqueleto em poedeiras em distintas fases da vida produtiva. Novos estudos serão necessários para avaliar esses potenciais marcadores genéticos quanto ao potencial uso na seleção assistida para melhorar a qualidade do tecido ósseo das aves.

2.8 Referências Bibliográficas

BISHOP, S. C.; FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. A.; FLOCK, D. K.; WHITEHEAD, C. C. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science**, v. 1668, p. 33–40, 2000.

BOYCE, B. F.; XING, L.; SHAKESPEARE, W.; WANG, Y.; DALGARNO, D.; IULIUCCI, J.; SAWYER, T. Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone metastases. **Kidney international**, v. 63, n. 85, p. S2–5, 2003.

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. **BioMed Central Genomics**, v. 15, p. 220, 2014.

BUDGEELL, K. L.; SILVERSIDES, F. G. Bone breakage in three strains of end-of-lay hens. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 745–747, 2004.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: introduction. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 982–984, 2000.

CRAIG, A. M.; DENHARDT, D. T. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. **Gene**, v. 100, p. 163–71, abr. 1991.

FIGUEIREDO, E. A. P. de; SCHMIDT, G. S.; ROSA, P. S.; LEDUR, M. C. O programa de melhoramento genético de aves da EMPRAPA. **III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**, p. 58–62, 2000.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SCHMIDT, G. S.; LEDUR, M. C.; AVILA, V. S.; BRUM, P. A. R.; FIORENTIN, L.; JAENISCH, F. R. . Genetic gain in egg production and egg weight in White Leghorn Embrapa 011. In: WORLD

CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.
REUNIÃO DA ASSOC. LATINOAMERICANA DE
PRODUÇÃO ANIMAL, 18, **Anais...**2003.

HANSEN, K. K.; KITTOCK, R. J.; SARATH, G.; TOOMBS, C. F.; CACERES, N.; BECK, M. M. Estrogen receptor-alpha populations change with age in commercial laying hens. **Poultry science**, v. 82, n. 10, p. 1624–1629, 2003.

HINCKE, M. T.; CHIEN, Y.-C.; GERSTENFELD, L. C.; MCKEE, M. D. Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, n. 5, p. 467–476, 2008.

KHOSLA, S. Update on estrogens and the skeleton. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 3569–3577, 2010.

LEDUR, M. C.; FIGUEIREDO, É. A. P.; PIENIZ, L. C.; SCHMIDT, G. S.; AVILA, V. S. de. Parâmetros Genéticos e Fenotípicos para Características de Qualidade do Ovo em Poedeiras de Ovos Brancos. In: Anais da 30 Reunião Anual da SBZ, **Anais...**1993.

LILBURN, M. S. Skeletal Growth of Commercial Poultry Species. **Poultry Science**, v. 73, n. 5, p. 897–903, 1994.

LIU, T. M.; LEE, E. H. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 3, p. 254–63, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MAZZUCO, H. **Avaliação da Mineralização Óssea e Qualidade da Casca em Poedeiras Comerciais Submetidas a um Programa Alternativo de Muda Induzida.** 2006.

MOTOTANI, H.; IIDA, A.; NAKAMURA, Y.; IKEGAWA, S. Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 28, n. 5, p. 547–53, 2010.

MURRY, C. E.; GIACHELLI, C. M.; SCHWARTZ, S. M.; VRACKO, R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 6, p. 1450–62, 1994.

NODA, M.; YOON, K.; PRINCE, C. W.; BUTLER, W. T.; RODAN, G. A. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 27, p. 13916–21, 1988.

O'REGAN, A.; BERMAN, J. S. Osteopontin: A key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 6, p. 373–390, 2000.

PALUDO, E.; IBELLI, A. M. G.; PEIXOTO, J. O.; TAVERNARI, F. C.; ZANELLA, R.; PANDOLFI, J. R. C. RUNX2 Plays an Essential Role in the Manifestation of Femoral Head Necrosis in Broilers. In: Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production RUNX2, **Anais...**2014.

PHILLIPS, C. L.; BRADLEY, D. a.; SCHLOTZHAUER, C. L.; BERGFELD, M.; LIBREROS-MINOTTA, C.; GAWENIS, L. R.; MORRIS, J. S.; CLARKE, L. L.;

HILLMAN, L. S. Oim mice exhibit altered femur and incisor mineral composition and decreased bone mineral density. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 219–226, 2000.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 1024–1032, 2000.

RIBEIRO, N.; SOUSA, S. R.; BREKKEN, R. a.; MONTEIRO, F. J. Role of sparac in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 1, p. 17–26, 2014.

RIGGS, C. M.; LANYON, L. E.; BOYDE, A. Functional associations between fibre orientation and locomotor strain direction in cortical bone of the equine radius. **Anatomy and Embryology**, v. 187, n. 3, p. 231–238, 1993.

ROSA, J. O. Desempenho E Reprodutivas De Aves Poedeiras. **Tese**, 2015.

RUBIN, C. **Functional genomics of bone metabolism**. 2008

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. e45–e45, 2009.

SAS, I. I. **System Requirements for SAS® 9.3 Foundation for Microsoft® Windows®**, 2012.

SAVEGNAGO, R. P.; CRUZ, V. a. R.; RAMOS, S. B.; CAETANO, S. L.; SCHMIDT, G. S.; LEDUR, M. C.; EL FARO, L.; MUNARI, D. P. Egg production curve fitting

using nonlinear models for selected and nonselected lines of White Leghorn hens. **Poultry Science**, v. 91, n. 11, p. 2977–2987, 2012.

SCHMIDT, G. S.; ANTONIO, E.; FIGUEIREDO, P. De; LEDUR, M. C.; MUNARP, D. P. Para Produção De Ovos Sobre O Desempenho No Segundo Ciclo. **Ciência Rural**, p. 1–6, 2004.

SCHREIWEIS, M. a; HESTER, P. Y.; MOODY, D. E. Identification of quantitative trait loci associated with bone traits and body weight in an F2 resource population of chickens. **Genetics, selection, evolution : GSE**, v. 37, n. 7, p. 677–698, 2005.

SHIM, M. Y.; KARNUAH, A. B.; MITCHELL, A. D.; ANTHONY, N. B.; PESTI, G. M.; AGGREY, S. E. The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. **Poultry science**, v. 91, n. 8, p. 1790–5, 2012a.

SHIM, M. Y.; KARNUAH, A. B.; MITCHELL, A. D.; ANTHONY, N. B.; PESTI, G. M.; AGGREY, S. E. The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. **Poultry science**, v. 91, n. 8, p. 1790–5, 2012b.

SHIMIZU-SASAKI, E.; YAMAZAKI, M.; FURUYAMA, S.; SUGIYA, H.; SODEK, J.; OGATA, Y. Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5459–66, 2001.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LÜTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, a; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell press**, v. 89, n. 2, p. 309–319, 1997.

THORP, B. H.; WADDINGTON, D. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. **Research in veterinary science**, v. 62, n. 1, p. 67–73, jan. 1997.

TURNER, R. T.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine reviews**, v. 15, n. 3, p. 275–300, jun. 1994.

VAN DE VELDE, J. P.; VERMEIDEN, J. P.; TOUW, J. J.; VELDHUIJZEN, J. P. Changes in activity of chicken medullary bone cell populations in relation to the egg-laying cycle. **Metabolic Bone Disease and Related Research**, v. 5, n. 4, p. 191–193, 1984.

WANG, M.; JIN, H.; TANG, D.; HUANG, S. Smad1 plays an essential role in bone development and postnatal bone formation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 19, n. 6, p. 751–762, 2011.

WEBSTER, a B. Welfare implications of avian osteoporosis. **Poultry science**, v. 83, n. 2, p. 184–192, 2004.

WHITEHEAD, C. C. Overview of bone biology in the egg-

laying hen. **Poultry science**, v. 83, n. 2, p. 193–199, 2004.

WHITEHEAD, C. C.; FLEMING, R. H. Osteoporosis in cage layers. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 1033–1041, 2000.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Ial**, n. 4^a ed, p. São Paulo, 2008a.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Procedimentos e determinações gerais. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, p. 1020, 2008b.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C. M.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. III. Skeletal Integrity. **Poultry Science**, v. 85, n. 10, p. 1700–1711, 2007.

3 Capítulo III. Fatores que influenciam a variação na expressão gênica no fêmur de linhagens de corte

Ediane Paludo¹, Jane de Oliveira Peixoto², Jose Rodrigo Claudio Pandolfi², Letícia Lopes², Carlos André da Veiga Lima Rosa¹, Mônica Corrêa Ledur²

¹Universidade do Estado de Santa Catarina,
Departamento de Ciência Animal, Lages, SC, Brasil ,
²EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

* monica.ledur@embrapa.br

3.1 RESUMO

Os avanços no melhoramento genético fizeram com que as aves crescessem mais rápido em menor período de tempo, com maior produção de partes comercialmente consideradas nobres, como peito, coxa, e com menor quantidade de gordura. Juntamente com este avanço no melhoramento genético para a produção, estão presentes algumas características indesejáveis para o desenvolvimento dos animais, como os problemas locomotores. Nas aves, os problemas locomotores estão relacionados com grandes prejuízos da agroindústria. As empresas de genética têm feito esforços para diminuir esses problemas, contudo, os resultados ainda são insatisfatórios. Desta forma, neste trabalho objetivou-se avaliar características fenotípicas do fêmur e da tíbia e a expressão de genes relacionados à integridade óssea no osso do fêmur, de duas linhagens uma selecionada (TT) para múltiplas características produtivas e uma linhagem controle (não selecionada LLc). Foram observadas diferenças significativas

($p < 0,05$) entre linhagens e/ou entre os sexos, para o peso, comprimento, espessura, força, flexibilidade, matéria seca, porcentagem de cinza, teores de cálcio, magnésio, fósforo e zinco dos ossos fêmur e tíbia. Na análise de expressão dos genes, foram obtidas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as linhagens em cada idade para os genes: *CALM2*, *SMAD1*, *COL1A2*, *RANKL*, *RUNX2* e *SPARC*. Entre sexos dentro de uma mesma linhagem também houve diferença significativa para os genes: *CALM2*, *SMAD1*, *TNFRSF11B*, *COL1A2*, *SPP1*, *IBSP* e *RANKL*. Desta maneira, é possível dizer que a expressão dos genes se diferencia dependendo da linhagem e do sexo. Diferenças nas características físico-químicas avaliadas ligadas a integridade óssea aumentaram entre as linhagens em decorrência do melhoramento que sofreram, acarretando variação na expressão de vários genes avaliados. Também foi observada influência de sexo dentro de uma mesma linhagem, possivelmente estando relacionados com a interação hormonal com os genes deste estudo. Este estudo possibilitou montar uma base de dados de características fenotípicas de ossos de duas linhagens de galinhas, dados estes que são escassos na literatura. Além disso, foi possível melhorar o entendimento sobre a variação na expressão de genes candidatos relacionados à ossificação em diferentes idades, sexo e linhagens.

Palavras-chave: osso – quantificação relativa – tíbia – fêmur - qPCR

3.2 ABSTRACT

Advances in breeding have made the birds grow faster in a shorter period of time, with a larger production

parts commercially considered noble, such as breast, thigh, lower amount of fat. Along with this progress in genetic improvement for the production, are present some undesirable characteristics for the development of animals, such as locomotor problems. Gait problems of birds are related to the loss agroindustry, genetics companies have made efforts to reduce these problems, however, the results are still unsatisfactory. In this way, this study aimed to evaluate phenotypic traits of the femur and tibia and the expression of genes related to bone integrity in the femur, one of two chicken lines: selected for multiple productive traits (TT) and a control line (non-selected; LLc). Differences were observed ($p < 0.05$) between the two lines, and/or gender, for weight, length, thickness, strength, flexibility, dry matter, ash percentage, calcium, magnesium, phosphorus and zinc bone of the femur and tibia. Regarding the gene expression, significant differences were obtained ($p < 0.05$) between lines at the same ages for the genes: *CALM2*, *SMAD1*, *COL1A2*, *RANKL*, *RUNX2* and *SPARC*. Between sexes within the same line, differences were found the genes: *CALM2*, *SMAD1*, *TNFRSF11B*, *COL1A2*, *SPP1*, *IBSP* and *RANKL*. Therefore, it is possible to say that the expression of genes differ according line and ages. Differences between lines increased due to the genetic section, resulting in variation in the expression of various genes evaluated, as well as, to the physico-chemical characteristics evaluated. It was also observed the gender influence within the same line, possibly being related to the hormonal interaction with the genes of this study. This study allowed to record phenotypic characteristics in bone traits database in two meat type chicken lines. Moreover, a better understanding about the change in gene expression

related to ossification at different ages, sex and lines was obtained.

Keywords: bone - relative quantification - femur – tibia – qPCR

3.3 Introdução

Os problemas esqueléticos em galinhas estão entre os principais motivos de descarte de carcaça na produção de frangos de corte. Nos Estados Unidos a estimativa de perda econômica é de \$120 milhões por ano (SULLIVAN, 1994).

Entre os problemas mais prevalentes que envolvem o esqueleto de frangos de corte, se encontra a necrose na cabeça do fêmur (ANGEL, 2007), a qual tem parte da sua causa desconhecida e pode afetar animais jovens da produção de aves (COOK, 2000). Muitos trabalhos apresentam causas diversas para a necrose na cabeça do fêmur, como problemas nutricionais, bacterianos e genéticos (WIDEMAN et al., 2012; WIDEMAN; PRISBY, 2013; JIANG et al., 2015).

Com o avanço genético e nutricional na produção de aves comerciais, a população de aves melhoradas passou a apresentar algumas características indesejáveis, as quais impactam negativamente a economia comercial. A seleção genética aplicada nas aves de corte não alterou o padrão de desenvolvimento e da densidade dos ossos longos do frango, ou seja, independente dos processos da seleção genética das aves, o desenvolvimento da densidade mineral óssea se manteve ao longo dos anos de seleção (ALMEIDA PAZ; BRUNO, 2006). Bishop et al. (2000) estiram a herdabilidade dos fatores genéticos para a ocorrência

dos problemas ocorridos nas pernas de aves como moderada ($h^2=0,4$).

Segundo Applegate e Lilburn (2002), em aves comerciais, o fêmur tem diferentes padrões de desenvolvimento, durante um período de crescimento até os 43 dias de idade, o qual ocorre na região associada ao crescimento linear do osso. Animais com o desenvolvimento normal do osso apresenta estrutura corporal para suportar o crescimento rápido do corpo.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo de avaliar a expressão de 10 genes relacionados com a integridade óssea no fêmur de uma linhagem selecionada para produção de carne e outra linhagem controle em duas idades distintas.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Coleta de Material Biológico

Foram utilizadas linhagens desenvolvidas no programa de melhoramento genético de aves da Embrapa Suínos e Aves. As linhagens TT e LLC apresentam mesma base genética, sendo oriundas raças Cornish, Hampshire e White Plymouth Rock. A partir de 1985, a linhagem TT foi selecionada para maior o peso corporal, melhor conversão alimentar, rendimento de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade, além de redução da gordura abdominal e doenças metabólicas. Já a linhagem LLC é uma linhagem controle que não foi selecionada para as múltiplas características ao longo dos anos. Mais informações sobre as referidas linhagens podem ser obtidas em Schmidt et al. (1998) e Figueiredo e Albino (2004).

Para cada linhagem foram realizadas coletas de 24 animais nas idades de 21 e 42 dias, sendo 12 fêmeas

e 12 machos em cada idade. Todos os animais usados neste estudo tiveram as mesmas condições de crescimento, usando a densidade de 10 aves por m², água e ração fornecido a vontade.

Durante a necropsia foi mensurado o peso do animal vivo e observado o escore corporal. Depois da sensibilização, foram coletados os ossos fêmur e tíbia da perna direita para análises fenotípicas e o osso do fêmur da perna esquerda foi dissecado, congelado em nitrogênio e armazenado em freezer à -80°C para a análise de expressão de RNA de cada animal.

3.4.2 Mensuração fenotípica

O fêmur e a tíbia coletados para as análises fenotípicas foram armazenados a 4°C por 24 horas e dissecados preservando somente os ossos, fêmur e tíbia, os quais foram pesados em balança de precisão e mensurados o comprimento e a espessura do meio do osso com paquímetro. Para a etapa seguinte os ossos foram conservados em temperatura de -20°C.

Para avaliar a força de quebra os ossos foram descongelados a 0°C por 48 horas, em seguida a temperatura ambiente por 1 hora. Para análise de resistência utilizou-se o aparelho TA – XTPlus *Texture Analyzer* (Texture Technologies Corporation), usando a sonda TA-92c (Texture Technologies Corporation). O lugar da quebra estabelecido foi à metade da distância entre as duas extremidades, desta forma estabelecendo uma medida fixa dos suportes laterais, para cada grupo de osso (fêmur e tíbia) e para cada idade de aves. A distância percorrida pela sonda após o toque na amostra será de 12 mm com velocidade de teste de 2,00 mm/s, velocidade de pré-teste de 2,00 mm/s e velocidade de pós-teste de 20,00 mm/s. A força peso com que a sonda

tocava na amostra, programada no equipamento era de 0.0050 Kg. Os valores obtidos pelo aparelho foram a força utilizada para a quebra e a distância percorrida pela sonda, a partir da razão destes valores foi calculada a flexibilidade (kg/mm) de cada osso quebrado.

Os ossos quebrados foram processados para obter os valores da matéria seca (MS), sendo aquecidos em estufa com temperatura de 105°C por 16 horas segundo o método 012/VI (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008a). Para obtenção do teor de MS multiplicou-se por 100% o peso das amostras em matéria seca e o resultado foi dividido pelo peso da amostra úmida.

Para a determinação de cinzas (%), as amostras da matéria seca foram colocadas em forno tipo mufla por aproximadamente seis horas, sendo que a temperatura da mufla foi aumentada gradativamente até chegar à temperatura máxima. Foram utilizados 350°C por uma hora, 450°C por uma hora, 550°C por uma hora e 600°C por três horas. A quantidade de cinza foi determinada por análise gravimétrica segundo o método 018/VI (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008a).

Para a determinação dos minerais, foi realizada a solubilização ácida das cinzas, que seguiu a metodologia descrita pelo Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2009) nº 38.

A determinação dos teores de cálcio (Ca), zinco (Zn) e magnésio (Mg) foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, em equipamento da marca VARIAN (ESPECTRA AA 220) seguindo as recomendações do fabricante. A determinação de teor de fósforo (P) foi realizada por espectrofotometria UV (AOAC 986.08), em equipamento da marca VARIAN (CARY 50) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4.3 Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA

Foram utilizados 100 mg de tecido do osso do fêmur congelado em freezer -80°C, macerados com auxílio de nitrogênio líquido e misturados em 1 mL de reagente Trizol® (Invitrogen) para isolar o RNA total. Depois de homogeneizado e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se 200 µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente. Logo após, as amostras foram centrifugadas em 12000 x g por 15 minutos em temperatura de 4°C para separar as fases. O RNA presente na fase aquosa foi coletado e precipitado com 1 volume de isopropanol 100%, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado em 12000 x g por 10 minutos em temperatura de 4°C. O resíduo formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado em 7500 x g por 5 minutos em temperatura de 4°C. Para finalizar o resíduo formado foi diluído com água tratada com DEPC (pirocarbonato de dietila).

O RNA extraído foi quantificado usando no espectrofotômetro Nanodrop, considerando o raio de OD260:OD280 com razão maior de 1.9, e a integridade foi confirmada em gel de agarose 1,5%. Para a síntese de cDNA foi utilizado 3 µg de RNA total usando o *kit Super Script II First-Strand Synthesis SuperMix®* (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

3.4.4 Análise de RT PCR em Tempo Real

Para a análise da expressão relativa foram escolhidos 10 genes candidatos: *SPP1* (que codifica a proteína osteopontina), *TNFRSF11B* (osteoprotegerina), *SPARC* (osteonectina), *CALM2* (Calmodulina 2), *IBSP*

(sialoproteína), *COL1A2* (cadeia polipeptídica alfa 2 do colágeno tipo I), *BMP2* (proteína morfogenética óssea 2), *RANKL* (fator ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa-B), *SMAD1* (proteína membro 1 da família SMAD), *RUNX2* (fator de transcrição relacionada ao fator Runt 2). A sequência foi obtida a partir da montagem do genoma de *Gallus gallus* v. 4.0 nos bancos de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os *primers* foram desenhados na junção exon-exon usando o programa primer-BLAST (YE et al., 2012) (Table 1). Além disso, os *primers* foram avaliados quanto a presença de estrutura secundária pelo software Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Para todos os genes estudados a eficiência de amplificação foi obtida usando o LinRegPCR (RUIJTER et al., 2009) e a especificidade foi avaliada pela análise da curva de dissociação.

A reação de RT-PCR em tempo real teve volume final de 15 μ L, contendo 1x de *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*® (2x) (*ThermoFisher Scientific*), 0,133 μ L de cada *primer* e 20 ng de cDNA. A análise foi realizada no *ABI Prism 7500 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*) usando corante de fluorescência *SYBR Green*. Foi utilizado um gene referência (*HMBS*) para normalizar o ciclo limiar (*Ct*) de cada amostra. A partir dos valores obtidos pelas duplicatas das amostras para cada gene, com a eficiência do primer entre 90 e 100% (Tabela 1), foi gerada a média para cada amostra e com esta calculou-se o $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. *Primers* usados na análise de qPCR

Gene	Primer(5'-3')	Bp	Ensembl ID	Accession number	Eficiência do primer
TNFRSF11B	F:5'-ACGCTTGCTGCTCTGGACAT-3'	193	ENSGALG00000016114	NM_001033641.1	0.93
	R5'-CAGCGTAGTACTGGCTGGG-3'				
RUNX2	F:5'-GATTACAGACCCAGGCAGG-3'	75	ENSGALG00000026484	NM_204128.1	0.92
	R:5'-TGGCTCAAGTAGGACGGGTA-3'				
CALB1	F:5'-GGCAGGCTTGGACTTAACAC-3'	143	ENSGALG00000015914	NM_205513.1	0.93
	R:5'-GCTGCTGGCACCTAAAGAAC-3'				
SMAD1	F:5'-GTTTTGTAAAGGGTTGGGAGC-3'	174	ENSGALG00000009977	NM_001201455.1	0.94
	R:5'-AATGCAGGAGCTTGGGACCTTA-3'				
HMBS	F:5'-ACTAGTTCACCTCGGCGAGC-3'	188	ENSGALG00000000291	XM_417846.3	0.92
	R:5'-CTCAGGAGCTGACCTATGCG-3'				
SPP1	F:5'-GAAAAATACGACCCAGGAG-3'	105	ENSGALG00000010926	NM_204535.4	0.92
	R:5'-TGAAGCCAGGCTATTCTGTG-3'				
SPARC	F:5'-GTATGAGCGCGATGAGGACA-3'	214	ENSGALG00000004184	NM_204410.1	0.92
	R:5'-GTGGGACAGGTACCCATCAA-3'				
CALM2	F:5'-CCACCATGGCTGATCAACTG-3'	191	ENSGALG00000010023	NM_205005.1	0.93
	R:5'-GCCATTGCCATCAGCGTCTA-3'				
IBSP	F:5'-CATCGCTACAAGGGCAGTGA-3'	100	ENSGALG00000010928	NM_205162.1	0.95
	R:5'-CTGCTGCCTGAGTACCTGTC-3'				
COL1A2	F:5'-TAAGGGTGAAATCGGACCTG-3'	88	ENSGALG00000009641	NM_001079714.2	0.93
	R:5'-ACCACTGGAAACGGAAGTC-3'				
BMP2	F:5'-AGCTTCCACCAGGAAGAT-3'	172	ENSGALG00000008830	NM_204358.1	0.93
	R:5'-GGTAGCTGCTGTTGCTCTCA-3'				
RANKL/ TNFSF11	F:5'-GACACGCCCTTTGAAAATCAGG-3'	100	ENSGALG000000026163	NM_001083361.1	0.94
	R:5'-TACGCTGGACTTCCTTCTGCG-3'				

Bp = Tamanho de amplificação (bp)

3.4.5 Análises Estatísticas

Para a análise estatística foi utilizada a metodologia estatística da análise de Variância, através do procedimento *MIXED do SAS™* (2012), testando-se os efeitos fixos de linhagem, para cada idade avaliada. Através do seguinte modelo linear:

$y = \mu + L + i + e$ onde:
y = representa o valor das características;
 μ = media geral da característica;
L = efeito fixo linhagem;
i = efeito fixo idade;
e = erro aleatório.

3.5 Resultados

3.5.1 Medidas fenotípicas

De acordo com os resultados, foram observadas diferenças significativas no peso vivo das aves entre as linhagens TT e LLc e também entre os sexos para as duas idades estudadas (Tabela 2). Para as duas idades, os machos da linhagem TT apresentaram maiores valores de peso vivo.

Tabela 2. Peso vivo das aves das linhagens puras TT e LLc aos 21 e 42 dias de idade

	Sexo	LLc	TT
21 dias	F	385,50±12,30	649,75±13,39
	M	441,08±15,38	745,83±22,33
42 dias	F	913,25±21,17	1543,75± 34,63
	M	1112,08± 40,94	1785,83± 36,77

* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

Diferença significativa entre sexo da mesma idade.

O peso e as características morfométricas dos ossos tíbia e fêmur apresentaram variações de acordo com a idade e grupo genético. Para os pesos dos ossos tíbia e fêmur, foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens e entre os sexos nas duas idades estudadas (Figuras 1A e 1B). Na análise do comprimento dos ossos (Figuras 1C e 1D), tíbia e fêmur apresentaram aos 21 dias de idade diferenças significativas somente entre as linhagens e aos 42 dias foram observadas diferenças significativas entre as linhagens e entre os sexos apenas para as aves da linhagem LLc. Para a

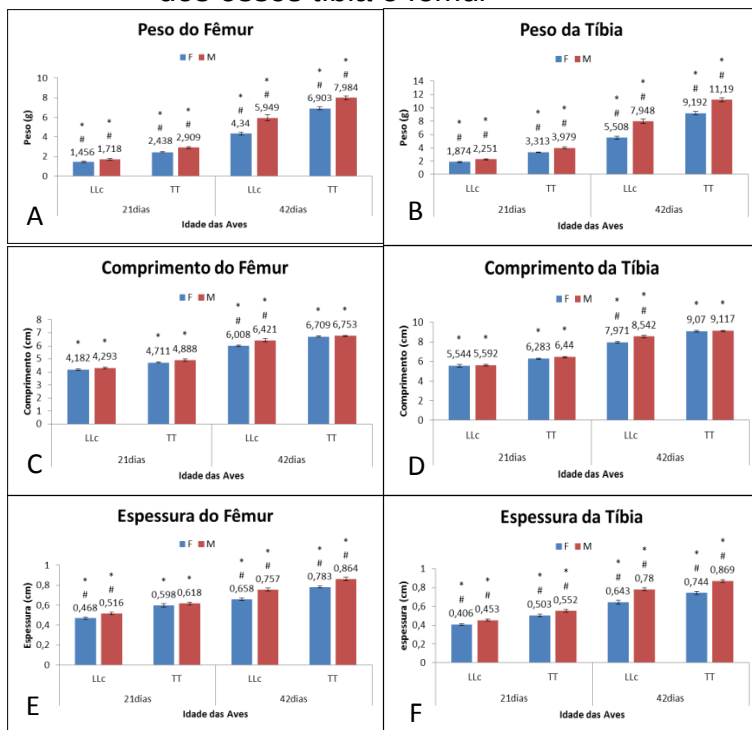
espessura dos ossos (Figuras 1E e 1F), foram observadas diferenças significativas entre as linhagens e o sexo dentro de cada idade, com exceção do fêmur da linhagem TT de 21 dias de idade que não apresentou diferença entre sexo. Observou-se maior espessura nos ossos das aves da linhagem TT em comparação com a linhagem LLc tanto para fêmur quanto para tíbia. Os machos apresentaram maior espessura de tíbia e fêmur que as fêmeas ($p < 0,05$).

Os valores encontrados para força de quebra do fêmur foram diferentes ($p < 0,05$) entre as linhagens nas aves de 21 dias, sendo maiores nas aves TT. Na linhagem LLc foi observado também que os machos apresentaram maior força de quebra do fêmur que as fêmeas, evidenciando o efeito de sexo nessa linhagem aos 21 dias de idade. Nas aves de 42 dias de idade, os fêmures de machos TT apresentaram maior força de quebra quando comparados com os fêmures da linhagem LLc, apresentando valores superiores aos fêmures das fêmeas TT, tendo diferença significativa entre sexo e entre linhagem para o grupo dos machos ($p < 0,05$) (Figura 2A).

Para a força da quebra da tíbia houve diferença significativa entre as linhagens e sexos, também sendo maior na linhagem TT (Figuras 2B e 2D). Além disso, para a flexibilidade do fêmur houve diferença significativa entre as linhagens nas duas idades estudadas (Figuras 2C e 2D), não sendo observado efeito de sexo. Já na análise de flexibilidade da tíbia, além do efeito de linhagem nas idades de 21 e 42 dias, observou-se efeito ($p < 0,05$) entre sexos somente dentro da linhagem TT nas aves de 42 dias de idade. Foi possível perceber que tanto a força de quebra quanto flexibilidade, comprimento, espessura e peso, para os dois ossos avaliados apresentam valores superiores na linhagem

TT. Isso ocorreu provavelmente, pois os animais TT apresentam maior peso vivo, característica que tem correlação positiva com crescimento ósseo.

Figura 1. Avaliação do peso, comprimento e espessura dos ossos tíbia e fêmur

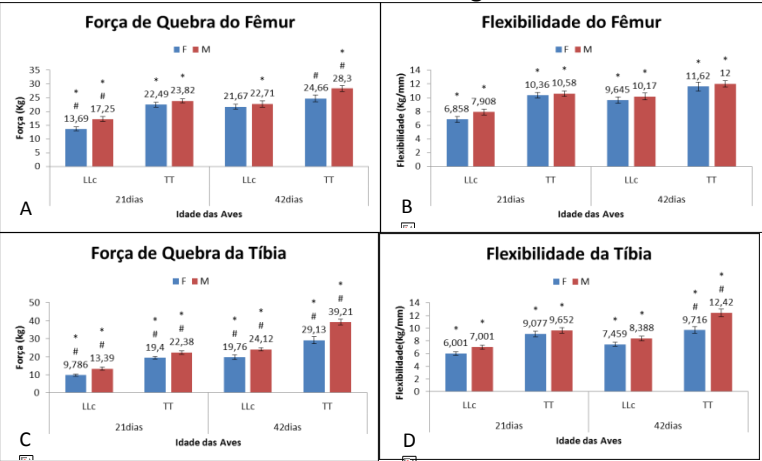


A) Peso do Fêmur; B) Peso da Tíbia; C) Comprimento do Fêmur; D) Comprimento da Tíbia; E) Espessura do Fêmur; F) Espessura da Tíbia.

* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

Figura 2. Variações na força de quebra e flexibilidade dos ossos tíbia e fêmur nas linhagens de corte



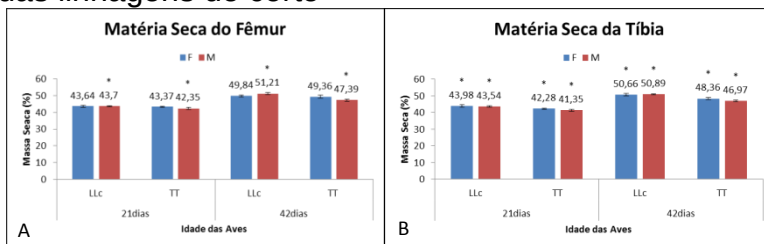
A) Força de quebra do fêmur; B) Flexibilidade do fêmur; C) Força de quebra da tíbia; D) Flexibilidade da tíbia.

* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

Para a porcentagem de matéria seca no fêmur, nas duas idades estudadas, foram encontrados valores significativos para o efeito de linhagem somente nos machos (Figura 3A). No osso da tíbia também foi encontrada diferença significativa entre as linhagens, porém, em machos e fêmeas, nas duas idades estudadas, com maiores valores de matéria seca na linhagem LLc (Figura 3B).

Figura 3. Teores de Matéria Seca dos ossos tíbia e fêmur das linhagens de corte



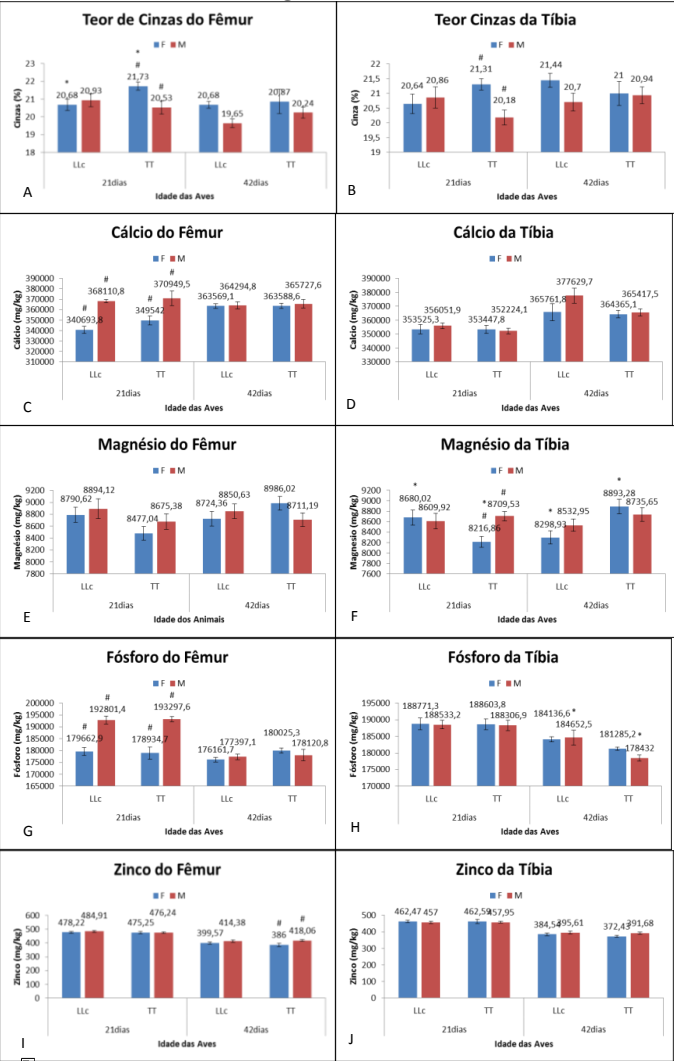
A) Matéria seca do fêmur; B) Matéria seca da tíbia.

* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

O teor de cinzas encontrado no fêmur das aves de 21 dias de idade apresentou diferença significativa entre as linhagens somente nas fêmeas e efeito significativo entre os sexos somente na linhagem TT (Figura 4A). O teor de cinzas encontrado na tíbia das aves de 21 dias de idade diferiu entre os sexos nas aves da linhagem TT (Figura 4B). Aos 42 dias de idade, os efeitos de linhagem e sexo não foram significativos para o teor de cinzas no fêmur e na tíbia.

A quantidade de cálcio no fêmur diferiu entre os sexos para as aves das duas linhagens aos 21 dias de idade (Figura 4C). Já o teor de cálcio na tíbia não foi significativo aos 21 dias. Da mesma forma, aos 42 dias os teores de cálcio no fêmur e na tíbia não diferiram significativamente (Figura 4D).

Figura 4. Composição química dos ossos tíbia e fêmur das linhagens de corte em diferentes idades



A) Cinza do Fêmur; B) Cinza da Tíbia; C) Cálcio do Fêmur; D) Cálcio da Tíbia; E) Magnésio do Fêmur; F) Magnésio da Tíbia; G) Fósforo do Fêmur; H) Fósforo da Tíbia; I) Zinco do Fêmur; J) Zinco da Tíbia.

* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

A quantidade de magnésio (Mg) presente no fêmur não foi significativamente diferente entre as linhagens e entre os sexos (Figura 4E). Os teores de Mg na tíbia apresentaram diferença significativa entre as linhagens para o grupo de fêmeas e entre os sexos na linhagem TT nas aves de 21 dias de idade. Já nas aves de 42 dias de idade houve diferença significativa somente entre linhagens para as fêmeas (Figura 4F).

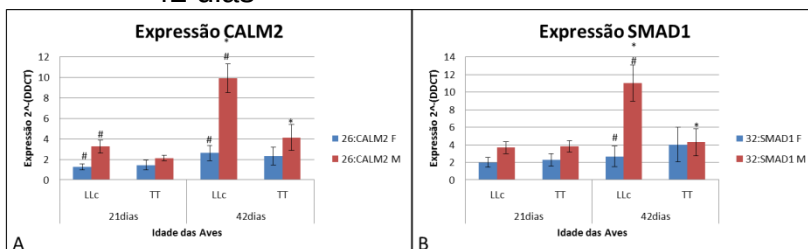
O teor de fósforo (P) encontrado no fêmur foi diferente entre os sexos das duas linhagens das aves aos 21 dias de idade. Já as aves de 42 dias de idade não apresentaram diferenças significativas (Figura 4G). Na tíbia a porcentagem de P foi significativamente diferente entre as linhagens no grupo dos machos na idade de 42 dias (Figura 4H). Para a porcentagem de zinco (Zn) houve diferença significativa apenas no osso do fêmur entre os sexos da linhagem TT nas aves de 42 dias de idade (Figura 4I). Já para o teor de Zn na tíbia (Figura 4J) as aves nas duas idades não apresentaram diferenças significativas entre as linhagens e entre sexos.

3.5.2 Análise de expressão gênica

Dentre os genes estudados, os que apresentaram maiores valores de expressão (*fold-change*) no fêmur foram *CALM2* e *SMAD1*. Para o gene *CALM2*, as aves de 21 dias de idade da linhagem LLc apresentaram diferenças significativas na expressão desse gene ($p < 0,05$) quando os sexos foram comparados, sendo maiores nos machos do que nas fêmeas. Aos 42 dias de idade, as aves continuaram apresentando diferenças na expressão gênica ($p < 0,05$) entre os sexos dentro da linhagem LLc e houve diferença significativa na

expressão deste gene entre as duas linhagens em estudo para o grupo dos machos (Figura 5A). O gene *SMAD1* foi diferencialmente expresso somente em aves de 42 dias de idade, apresentado diferenças devido ao efeito de linhagem somente para os machos, e de sexo na linhagem LLc (Figura 5B). Para os dois genes avaliados, aos 42 dias de idade, os machos LLc apresentaram-se aproximadamente 2,5 vezes mais expressos que os machos TT. Aos 21 dias e entre as fêmeas, não foram observadas variações na expressão dos genes.

Figura 5. Expressão dos genes *CALM2* (A) e *SMAD1* (B) nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias

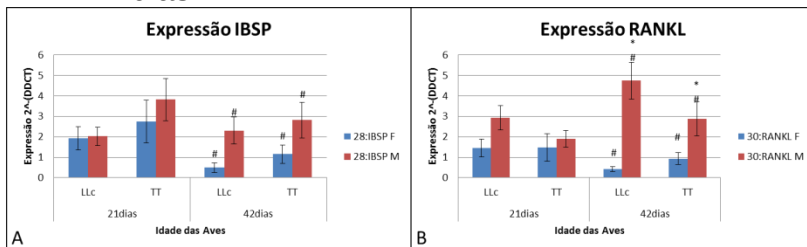


* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

A expressão dos genes *IBSP* e *RANKL* variou somente nas aves de 42 dias de idade (Figura 6A e 6B), sendo que a expressão do gene *IBSP* foi influenciada pelo sexo da ave nas duas linhagens estudadas. O gene *RANKL* foi cerca de 8 vezes mais expresso nos fêmures de machos do que no fêmur das fêmeas na linhagem LLc e 2 vezes mais expresso na linhagem TT. Além disso, nessa idade, o gene *RANKL* foi 1,5 mais expresso ($p < 0,05$) em machos da linhagem LLc do que na TT (Figura 6B).

Figura 6. Expressão dos genes *IBSP* (A) e *RANKL* (B), A nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias

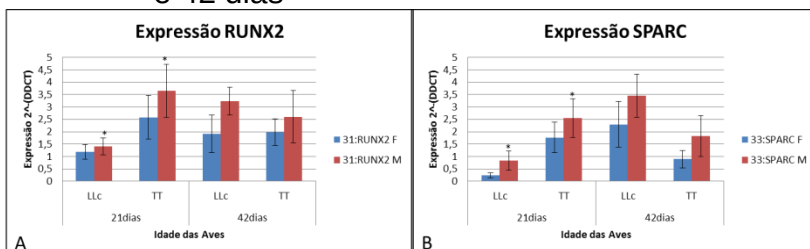


* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

Os genes *RUNX2* e *SPARC* foram expressos com diferença significativa somente entre as linhagens para o grupo dos machos das aves de 21 dias de idade (Figura 7A e 7B). Não houve diferença significativa para as demais idades e entre os sexos.

Figura 7. Expressão dos genes *RUNX2* (A) e *SPARC* (B), nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias

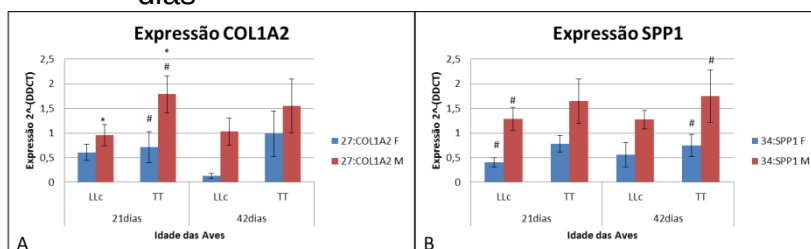


* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

A expressão do gene *COL1A2* apresentou diferença na expressão entre linhagens para os machos na linhagem TT aos de 21 dias de idade ($p < 0,05$) (Figura

8A). Considerando dentro de linhagens, os machos TT de 21 dias apresentaram 2,3 vezes mais expressão desse gene em relação às fêmeas (Figura 8A). Quanto a expressão do gene *SPP1*, houve diferença entre sexos para a linhagem LLc aos 21 dias de idade e na linhagem TT das aves de 42 dias de idade, com machos apresentando maiores níveis de expressão (Figura 8B).

Figura 8. Expressão dos Genes *COL1A2* (A) e *SPP1* (B), nas Linhagens TT e LLc nas idades de 21 e 42 dias



* Diferença significativa entre linhagens da mesma idade.

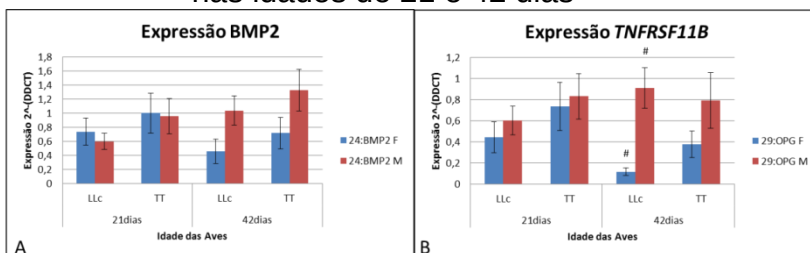
Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

Os genes *BMP2* e *TNFRSF11B* foram os que apresentaram valores mais baixos de expressão quando comparados com os outros genes deste estudo. O gene *BMP2* não apresentou diferença significativa entre as linhagens e os sexos (Figura 9A), enquanto o gene *TNFRSF11B* apresentou diferença entre os sexos na linhagem LLc das aves de 42 dias de idade, sendo em média 9 vezes menos expressos em fêmeas (Figura 9B).

Embora não tenha sido realizada uma comparação entre as duas idades, pode-se observar analisando os gráficos acima que alguns genes (*IBSP*, *RANKL*, *RUNX2*) apresentaram valores de *fold-change* maiores aos 21 dias do que aos 42 dias de idade, enquanto que outros genes, como *CALM2*, *SMAD1*,

apresentaram uma tendência de maior expressão aos 42 dias. Além disso, genes como *SPARC*, *COL1A2* e *BMP2* apresentaram padrões distintos entre machos e fêmeas e entre linhagens.

Figura 9. Expressão dos Genes *BMP2* (A) e *TNFRSF11B*(B), nas Linhagens TT e LLC nas idades de 21 e 42 dias



Diferença significativa entre sexo da mesma linhagem.

3.6 Discussão

A melhoria na eficiência produtiva de aves de corte foi muito intensa nas ultimas décadas e os principais fatores para esse desenvolvimento formam as melhorias na genética e manejo das aves (HAVENSTEIN; FERKET; SCHEIDELER; LARSON, 2003). Considerando a genética das aves, houve ganho na taxa de crescimento e rendimento de carne, mas com isso também foram agregadas características indesejáveis como os problemas de pernas (LI et al., 2002). Dessa forma, nesse estudo buscou-se investigar a influência da seleção genética sobre a expressão de genes relacionados à integridade óssea em duas linhagens de corte, sendo uma na 20^a geração de seleção para múltiplas características e uma linhagem controle.

Foram mensurados fenótipos relacionados à integridade óssea dos membros inferiores das aves, para caracterizar o material genético estudado. O peso vivo encontrado nas aves deste estudo foi menor que o esperado, e demonstrado em outros estudos nestas mesmas populações (SOUZA et al., 2013; VENTURINI et al., 2014; GRUPIONI et al., 2015). Isso se deve, provavelmente, a uma variação amostral devido a pequena quantidade de animais estudados neste trabalho. Para diversas características como peso, comprimento, espessura, força de quebra, flexibilidade e matéria seca dos ossos fêmur e tíbia, cinzas do fêmur e magnésio da tíbia, foram observadas diferenças entre as linhagens, indicando que o melhoramento aplicado à linhagem TT possa ter alterado essas características ao longo dos anos. É interessante notar que apesar da flexibilidade e força de quebra terem apresentado valores maiores na linhagem TT do que na linhagem LLc, quando se observa os valores de matéria seca, há um maior teor nas linhagens LLc do que na TT, para as duas idades, e especialmente para machos. Esses dados apontam para a importância de uma matriz orgânica equilibrada do osso, já que a matéria seca é constituída pela parte orgânica e mineral do osso, e que de acordo com os dados apresentados neste trabalho, houve poucas diferenças significativas nos teores de minerais avaliados.

Além disso, os resultados obtidos para a linhagem TT de 42 dias de idade nas características de comprimento, espessura, peso, matéria seca, força e cinzas do fêmur e da tíbia, e cálcio, magnésio e zinco do fêmur foram semelhantes aos dados obtidos por Fornari (2012), Souza et al. (2013) e Grupioni et al. (2015) que utilizaram o mesmo grupo genético diferenciando apenas na geração. Apesar da grande importância dos

problemas locomotores, informações sobre as características fenotípicas como as avaliadas neste estudo são escassas e praticamente inexistentes na literatura. Com isso, foi possível observar os valores médios de características como teor de cinzas, massa seca e quantidade de alguns minerais essenciais para a ossificação, permitindo um maior entendimento das características de integridade óssea nas linhagens estudadas.

Com as diferenças entre os grupos genéticos para as características fenotípicas, foram investigados genes candidatos envolvidos com a fisiologia óssea visando entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na ossificação. Dos 10 genes envolvidos com o metabolismo ósseo das duas linhagens estudadas, seis apresentaram-se diferencialmente expressos entre as linhagens TT e LLc (*CALM2*, *SMAD1*, *COL1A2*, *RANKL*, *RUNX2* e *SPARC*). Os genes *SMAD1*, *CALM2* e *RANKL*, na idade de 42 dias foram super expressos na linhagem controle em comparação com a linhagem selecionada, sendo *SMAD1* e *CALM2* 2,5 vezes mais expressos e *RANKL* 1,5 vezes em LLc. Os três genes estão relacionados com o tecido ósseo, sendo na formação do osso pós-natal quando o *SMAD1* é um sinalizador da BMP, sendo essencial para a formação do osso (WANG et al., 2011), o *CALM2* é abundantemente expresso nas articulações dos condrócitos sendo muito importante para mobilização do cálcio intracelular (MOTOTANI et al., 2010) e o *RANKL* é regulado pela mobilização do Ca^{2+} (SUTTON et al., 2015), além de estimular a função osteoblastos (BOYCE; XING, 2007). Em linhas gerais, esses três genes apresentam grande importância na atividade de osteoclastos. Estas células são responsáveis pela reabsorção óssea e manutenção da homeostasia dos minerais (BOYLE; SIMONET; LACEY,

2003). Tanto *SMAD1* quanto *RANKL* são estimulados por BMPs, aumentando a atividade dos osteoclastos (TASCA et al., 2015). Já o gene da calmodulina apresenta uma função dinâmica e direta na atividade de maturação dos osteoclastos, regulando o processo de apoptose destas células mediadas pelo via *fas-apoptotic* (WILLIAMS; MICOLIB; MCDONALD, 2010), além de estimular a expressão de *SMAD1* e *RANKL* pela via dependente de cálcio/calmodulina (SCHERER; GRAFF, 2000; ANG et al., 2007). A maior expressão desses genes em LLc pode ser relacionada com a variação no teor de matéria seca, já que grande parte dela é formada pela parte orgânica do osso, que também foi maior na linhagem LLc do que na TT. Também foi possível observar diferença nos níveis de expressão relacionados ao sexo, sendo que fêmeas apresentaram sempre níveis de expressão 2 a 5 vezes menor do que os machos.

Aves fêmeas LLc de 21 dias e 42 dias de idade apresentaram menores níveis de expressão para os genes *CALM2* e *SMAD1* respectivamente, enquanto que para o gene *RANKL*, essa diferença foi encontrada tanto para os animais LLc quanto TT aos 42 dias. Essas diferenças devem ocorrer devido aos diferentes níveis de hormônios sexuais, que estão presentes em praticamente todos os tipos celulares do organismo e apresentam uma função de diferenciação celular não apenas no desenvolvimento, mas também na manutenção e renovação de tecidos adultos (MICHAEL et al., 2005).

Para os genes *COL1A2*, *RUNX2* e *SPARC* diferenças significativas entre as linhagens na idade de 21 dias, em que a linhagem TT apresentou maior expressão do que a linhagem LLc. Os genes *COL1A2* e *RUNX2* são indispensáveis na composição óssea (DENG et al., 2003). O desenvolvimento normal do osso

depende do nível de expressão do gene *RUNX2*, e a sua baixa expressão resulta em anomalias do tecido. Atua principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento como cofator dos osteoblastos na formação do osso (LIU; LEE, 2013). O gene *SPARC* está associado com a formação, desenvolvimento e remodelação do tecido ósseo e na montagem dos filamentos de colágeno (RIBEIRO; SOUSA; BREKKEN; MONTEIRO, 2014). Sua expressão tem sido associada a conferir força ao osso, permitindo a calcificação da matriz extracelular do mesmo (PARVANEH et al., 2015). Os níveis de expressão desses genes, geralmente foram maiores nos animais aos 21 dias, possivelmente por serem genes importantes principalmente no desenvolvimento e maturação do tecido ósseo.

Para o gene *IBSP* foi observada diferença de expressão entre os sexos das duas linhagens nas aves de 42 dias de idade e para o gene *TNFRSF11B* também foi encontrada diferença entre os sexos, mas somente para a linhagem LLC. É possível que a diferença de expressão encontrada no nosso estudo esteja relacionada com hormônios sexuais, pois em humanos a adiponectina inibe a expressão do gene *TNFRSF11B* em osteoblastos através do receptor de adiponectina (LUO et al., 2006). E o gene *IBSP* é correlacionado com o hormônio de crescimento em cultivo de células de osteoblasto (HAASE; IVANOVSKI; WATERS; BARTOLD, 2003), evidenciando que a diferença entre os sexos pode ser devido as condições hormonais do organismo.

A maioria dos genes em estudo apresentaram interações com hormônios, o que pode explicar diferenças observadas na expressão entre os diferentes sexos e entre linhagens. A expressão do gene *CALM2* está relacionada com atividade hormonal do fígado, ovário, oviduto e hipófise (STEIN et al., 1983; ZHANG et

al., 2012) e o *RANKL* apresenta expressão nos tecidos linfoides (QUINN et al., 1998). O gene *TNFRSF11B* é um medidor de estrógeno no osso (HOFBAUER et al., 1999). Fornari et al. (2014) estudaram um polimorfismo de única base (SNP) no gene *TNFRSF11B* cujo efeito foi influenciado pela interação com sexo para algumas características de carcaça na mesma linhagem do nosso estudo (TT). Além disso, estes autores relataram associação do SNP no gene *TNFRSF11B* com peso e força de quebra da tíbia em frangos de corte da linhagem TT aos 42 dias de idade.

De acordo com os resultados, nas linhagens de corte, o efeito do sexo da ave foi importante fator de variação afetando a expressão dos genes candidatos relacionados ao metabolismo ósseo. Do total de genes avaliados, sete apresentaram expressão diferencial dependente do sexo da ave, sendo eles: *CALM2*, *SMAD1*, *TNFRSF11B*, *COL1A2*, *SPP1*, *IBSP* e *RANKL*. Além disso, a expressão de seis destes genes foi influenciada pela interação entre sexo e linhagem. Possivelmente um dos fatores associados à expressão diferencial dos genes observada seja a influência direta de hormônios sexuais sobre os genes em estudo. Os hormônios sexuais e seus receptores desempenham ampla ação sobre o desenvolvimento, maturação e manutenção do esqueleto tanto em fêmeas (KHOSLA, 2010) quanto em machos (KHOSLA, 2002). Nesse estudo, a interação entre o *TNFRSF11B* e o sexo pode estar relacionada a grande influência que o hormônio sexual feminino estrógeno exerce sobre a expressão deste gene. Em humanos, o estrógeno estimula os osteoblastos a aumentarem a produção de osteoprotegerina (HOFBAUER et al., 1999). O gene da osteopontina (*SPP1*) também é regulado por hormônios como estrógeno, progesterona, além de vitamina D3,

citocinas e fatores de crescimento (NODA et al., 1988; CRAIG; DENHARDT, 1991).

3.7 Conclusão

Neste trabalho foi possível concluir que existe diferença significativa entre a linhagem selecionada para a produção de carne e a linhagem controle que foi mantida sem seleção. Além disso, para algumas características e genes foram observadas diferenças entre sexos e idade das linhagens. Os genes *CALM2*, *SMAD1* e *RANKL* foram significativamente mais expressos na linhagem LLc quando comparado com a linhagem TT nas aves de 42 dias de idade, enquanto os genes *IBSP*, *RANKL*, *CALM2*, *SMAD1*, *COL1A2* e *SPP1* foram diferencialmente expressos entre machos e fêmeas

Este estudo possibilitou montar uma base de dados de características fenotípicas de ossos de duas linhagens de galinhas, dados estes que são escassos na literatura. Além disso, permitiu melhor entendimento sobre a variação na expressão de genes candidatos relacionados à ossificação em diferentes idades, sexo e linhagens.

3.8 Referências Bibliográficas

ALMEIDA PAZ, I. C. L.; BRUNO, L. Bone mineral density : review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 69–73, 2006.

ANG, E. S. M.; ZHANG, P.; STEER, J. H.; TAN, J. W.-Y.; YIP, K.; ZHENG, M. H.; JOYCE, D. A.; XU, J. Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase Activity is Required for Efficient Induction of Osteoclast

Differentiation and Bone Resorption by Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL). **Journal of cellular physiology**, v. 207, p. 12–22, 2007.

ANGEL, R. Metabolic disorders: Limitations to growth of and mineral deposition into the broiler skeleton after hatch and potential implications for leg problems. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 1, p. 138–149, 2007.

BISHOP, S. C.; FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. A.; FLOCK, D. K.; WHITEHEAD, C. C. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science**, v. 1668, p. 33–40, 2000.

BOYCE, B. F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. S1, 2007.

BOYCE, B. F.; XING, L.; SHAKESPEARE, W.; WANG, Y.; DALGARNO, D.; IULIUCI, J.; SAWYER, T. Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone metastases. **Kidney international. Supplement**, v. 63, n. 85, p. S2–5, 2003.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: introduction. **Poultry science**, v. 79, p. 982–984, 2000.

CRAIG, A. M.; DENHARDT, D. T. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. **Gene**, v. 100, p. 163–71, 1991.

DENG, F. Y.; LIU, M. Y.; LI, M. X.; LEI, S. F.; QIN, Y. J.; ZHOU, Q.; LIU, Y. J.; DENG, H. W. 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.

FIGUEIREDO, E. A. P. de; ALBINO, J. **LINHAGENS COMERCIAIS DE GALINHAS PARA CORTE E POSTURA**. 2004.

FORNARI, M. B. Investigação De Polimorfismos Em Genes Associados Ao Desenvolvimento Ósseo Como Marcadores Moleculares Para Características De Integridade Óssea Em Uma Linhagem Paterna De Frangos De Corte. **Tese**, p. 125, 2012.

FORNARI, M. B.; ZANELLA, R.; IBELLI, A. M.; FERNANDES, L. T.; CANTÃO, M. E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J. O. Unraveling the associations of osteoprotegerin gene with production traits in a paternal broiler line. **Springer Plus**, v. 3, n. 1, p. 682, 2014.

GRUPIONI, N. V.; CRUZ, V. A. R.; STAFUZZA, N. B.; FREITAS, L. A.; RAMOS, S. B.; SAVEGNAGO, R. P.; PEIXOTO, J. O.; LEDUR, M. C.; MUNARI, D. P. Phenotypic, genetic and environmental parameters for traits related to femur bone integrity and body weight at 42 days of age in a broiler population. **Poultry Science**, v. 94, n. 11, p. 2604–2607, 2015.

HAASE, H. R.; IVANOVSKI, S.; WATERS, M. J.; BARTOLD, P. M. Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblasts and alveolar bone-derived cells. **Journal of periodontal research**, v. 38, p. 366–374, 2003.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991

broilers when fed representative 1957 and 1991 broiler diets. **Poultry science**, v. 82, p. 1500–1508, 2003.

HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L.; SPELSBERG, T. C.; RIGGS, B. L. Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells. **Endocrinology**, v. 140, p. 4367–4370, 1999.

JIANG, T.; MANDAL, R. K.; WIDEMAN, R. F.; KHATIWARA, A.; PEVZNER, I.; MIN KWON, Y. Molecular Survey of Bacterial Communities Associated with Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) in Broilers. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0124403, 2015.

KHOSLA, S. Oestrogen, bones and men: When testosterone just isn't enough. **Clinical Endocrinology**, v. 56, n. 3, p. 291–293, 2002.

KHOSLA, S. Update on estrogens and the skeleton. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 3569–3577, 2010.

LI, H.; DEEB, N.; ZHOU, H.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Chicken Quantitative Trait Loci for Growth and Body Composition Associated with Transforming Growth Factor- β Genes 1. **Poultry Science**, 2002.

LILBURN, M. S. Skeletal Growth of Commercial Poultry Species. **Poultry Science**, v. 73, n. 5, p. 897–903, 1994.

LIU, T. M.; LEE, E. H. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. **Tissue engineering**, v. 19, n. 3, p. 254–63, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative

gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUO, X.-H.; GUO, L.-J.; XIE, H.; YUAN, L.-Q.; WU, X.-P.; ZHOU, H.-D.; LIAO, E.-Y. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 10, p. 1648–1656, 2006.

MICHAEL, H.; HÄRKÖNEN, P. L.; VÄÄNÄNEN, H. K.; HENTUNEN, T. A. Estrogen and Testosterone Use Different Cellular Pathways to Inhibit Osteoclastogenesis and Bone Resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 12, p. 2224–2232, 2005.

MOTOTANI, H.; IIDA, A.; NAKAMURA, Y.; IKEGAWA, S. Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 28, n. 5, p. 547–53, 2010.

NODA, M.; YOON, K.; PRINCE, C. W.; BUTLER, W. T.; RODAN, G. A. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type beta transforming growth factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 27, p. 13916–21, 1988.

PARVANEH, K.; EBRAHIMI, M.; SABRAN, M. R.; KARIMI, G.; HWEI, A. N. M.; ABDUL-MAJEED, 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.

QUINN, A. D.; KETTLEWELL, P. J.; MITCHELL, M. A.; KNOWLES, T. Air movement and the thermal microclimates observed in poultry lairages. **British poultry science**, v. 39, n. 4, p. 469–76, set. 1998.

RIBEIRO, N.; SOUSA, S. R.; BREKKEN, R. a.; MONTEIRO, F. J. Role of sparc in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 1, p. 17–26, 2014.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. e45–e45, 2009.

SAS, I. I. **System Requirements for SAS® 9.3 Foundation for Microsoft® Windows®**, 2012.

SCHERER, A.; GRAFF, J. M. Calmodulin differentially modulates Smad1 and Smad2 signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 52, p. 41430–8, 29 dez. 2000.

SCHMIDT, G. S.; FIGUEIREDO, E. A. P. DE; LEDUR, M. C.; MUNARI, D. P.; GOMES, J. P. EFEITO DA SELEÇÃO QUANTO AO PESO CORPORAL NAS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM LINHAGENS DE FRANGOS DE CORTE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1595–99, 1998.

SOUZA, C. G. de; VENTURINI, G. C.; GRUPIONI, N. V.; PEIXOTO, J. de O.; LEDUR, M. C. 4; MUNARI, D. P. Variabilidade genética do peso corporal e integridade óssea da tíbia em uma linhagem paterna de frangos de corte Camila. **Anais...** p. 2014–2016, 2013.

SOUZA, C. G. de; VENTURINI, G. C.; GRUPIONI, N. V.; PEIXOTO, J. de O.; LEDUR, M. C.; MUNARI, D. P.

Variabilidade genética do peso corporal e integridade óssea da tíbia em uma linhagem paterna de frangos de corte. **Anais...** p. 2014–2016, 2015.

STEIN, J. P.; MUNJAAL, R. P.; LAGACE, L.; LAI, E. C.; O'MALLEY, B. W.; MEANS, a R. Tissue-specific expression of a chicken calmodulin pseudogene lacking intervening sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 21, p. 6485–9, 1983.

SULLIVAN, T. W. Skeletal Problems in Poultry: Estimated Annual Cost and Descriptions. **Poultry Science**, v. 73, p. 879–882, 1994.

SUTTON, K. M. C.; HU, T.; WU, Z.; SIKLODI, B.; VERVELDE, L.; KAISER, P. The functions of the avian receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and its receptors, RANK and osteoprotegerin, are evolutionarily conserved. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 51, n. 1, p. 170–184, 2015.

TASCA, A.; STEMIG, M.; BROEGE, A.; HUANG, B.; DAVYDOVA, J.; ZWIJSEN, A.; UMANS, L.; JENSEN, E. D.; GOPALAKRISHNAN, R.; MANSKY, K. C. Smad1/5 and Smad4 expression are important for osteoclast differentiation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116, n. 7, p. 1350–60, jul. 2015.

VENTURINI, G. C.; CRUZ, V. A. R.; ROSA, J. O.; BALDI, F.; FARO, L. El. Genetic and phenotypic parameters of carcass and organ traits of broiler chickens. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 10294–10300, 2014.

WANG, M.; JIN, H.; TANG, D.; HUANG, S. Smad1 plays

an essential role in bone development and postnatal bone formation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 19, n. 6, p. 751–762, 2011.

WIDEMAN, R. F.; HAMAL, K. R.; STARK, J. M.; BLANKENSHIP, J.; LESTER, H.; MITCHELL, K. N.; LORENZONI, G.; PEVZNER, I. A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: Evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. **Poultry Science**, v. 91, p. 870–883, 2012.

WIDEMAN, R. F.; PRISBY, R. 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**, v. 3, n. JAN, p. 1–14, 2013.

WILLIAMS, J. P.; MICOLIB, K.; MCDONALD, J. M. Calmodulin – an Often Ignored Signal in Osteoclasts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 358–364, 2010.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BioMed Central Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Ial**, n. 4^a ed, p. São Paulo, 2008a.

ZHANG, Z.; XIAO, L.; WANG, Y.; CHEN, S.; YANG, Z.; ZHAO, X. mRNA expression profiles of calmodulin and liver receptor homolog-1 genes in chickens. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 3482–3489, 2012.

4 Capítulo IV. Downregulation of RUNX2 and SPARC genes and the manifestation of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers

Ediane Paludo¹, Jane de Oliveira Peixoto², Fernando de Castro Tavernari², Carlos André da Veiga Lima-Rosa¹, José Rodrigo Pandolfi², Mônica Corrêa Ledur²

¹Santa Catarina State University, Department of Animal Science, Lages, SC, Brazil, ²EMBRAPA Swine and Poultry, Concórdia, SC, Brazil

* monica.ledur@embrapa.br

4.1 Abstract

Economic losses due to an increase of leg disorders in broilers have become a major concern of the poultry industry. Despite the efforts to reduce skeletal abnormalities in chickens, insufficient progress has been made. Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) is one of the main factors that affect the bone integrity in broilers. However, the genetic pathways and genes involved in most bone diseases, including BCO, remains unclear. In this study, femoral samples from male broilers with 45 days of age affected or not with BCO were used to compare the relative expression with a reverse transcription real time PCR approach of 12 candidate genes: *SPP1* (protein coding osteopontin), *TNFRSF11B* (osteoprotegerin), *SPARC* (osteonectin), *CALB1* (calbindin 1), *CALM* (Calmodulin 2), *IBSP* (sialoprotein), *COL1A2* (collagen, type I, alpha 2), *BMP2* (bone morphogenetic protein 2), *RANKL* (kappa-B nuclear factor ligand), *SMAD1* (SMAD family member 1), *LEPR* (leptin receptor) and *RUNX2* (related transcription

factor Runt 2). Differential expression test was performed using the REST software. When the gene expression of the two groups was compared, the *RUNX2* and *SPARC* genes were downregulated ($p < 0.05$) in the affected group, with reduced expression of four fold when compared to the non-affected group. This result may indicate that the repression of the *RUNX2* and *SPARC* could contribute to an increased incidence of BCO in broilers.

Keywords: Leg disorders – femoral head necrosis – osteonectin – BCO – locomotor problems - poultry

4.2 Introduction

In the last decades, the poultry production system has focused on intense selection for heavier and faster growing broilers (HAVENSTEIN et al., 2003). The intense selection for rapid growth and the intensification of the production system in the poultry industry have negatively impacted the quality of the skeleton structure in meat-type chickens. This has resulted in an increased number of animals with bone-related problems (COOK, 2000; HAVENSTEIN et al., 2003; ZHOU et al., 2007). As a consequence, the incidence of locomotor problems has increased significantly, causing a negative impact on welfare, feed efficiency, growth performance and other traits (COOK, 2000). Those problems led to annually economic losses over \$100 million dollars (COOK, 2000), being considered one of the main concerns to the poultry industry (OVIEDO-RONDÓN, 2007).

Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) is one of the most important leg disorders in commercial broilers and it has been diagnosed worldwide (MCNAMEE; SMYTH, 2000). This pathology is also

known as Femoral Head Necrosis (FHN) and the genetic mechanisms involved are not completely understood. The pathogenesis of BCO appears to be initiated by mechanical damage to poorly mineralized columns of chondrocytes (cartilage cells) in the epiphyseal and physeal growth plates of the leg bones, followed by colonization of osteochondritic clefts by opportunistic bacteria (Wise, 1975; Wideman et al., 2012; Wideman & Prisby, 2013). Numerous bacterial species of opportunistic organisms in mixed cultures have been isolated from BCO lesions, including predominately *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. (Wideman et al., 2012). Recently, Jiang et al. (2015), studying the diversity of the bacterial communities, suggested that certain bacterial subgroups are preferentially selected in association of BCO lesions. BCO is the most common cause of lameness and is an important cause of mortality in fast-growing broilers, affecting approximately 1.5% of slaughtered chickens at 42 days age in the United States (WIDEMAN et al., 2012; WIDEMAN; PRISBY, 2013). In Brazil, there is no consistent data on the incidence of this problem.

Genetics is an important factor that plays a considerable role in the development of the skeletal system (COOK, 2000; ZHOU et al., 2007) being the bone considered a dynamic tissue that could be influenced by many physical, physiological and nutritional factors (RATH et al., 2000). Genetic variation has been observed and heritability for some bone integrity traits has been estimated around 0.4 (Bishop et al., 2000). Also, QTLs (quantitative trait loci) have been mapped on chromosomes GGA1, GGA2, GGA4 and others in chickens (Schreiweis et al., 2005; Dunn et al., 2007; Zhang et al., 2010; Zhou et al., 2007; Ragognetti et al., 2015) indicating important regions related to skeletal

system. A potential large number of functional candidate genes involved with bone metabolism can be found in the QTL regions previous cited, however there are few association studies with bone integrity traits in chickens (Bennett, Hester, & Spurlock, 2006; Fornari et al., 2014). Furthermore, the functional pathways, specially associated a BCO, are still unknown in chicken, since the studies are available mostly in humans and rodents. Also, it is known that chickens have different bone physiology, with quicker bone remodeling when compared to mammals (JOHNSSON et al., 2015). In this way, attempting to clarify the pathways involved in BCO in chicken, this is the first study that aims to evaluate the expression profile of 12 functional candidate genes at the femur growth plates of normal and affected with BCO in broilers at 45 days of age.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Experimental animals and husbandry

A total of 20 Cobb 500 male broilers vaccinated against fowl pox and Marek disease at the hatchery were used in this study. The drinkers, feeders, curtains, light, and chickens were managed following the recommendations for this commercial line. Water and feed were supplied *ad libitum* during the experiment. The chicks were brooded using infrared lamps, and the height was adjusted for bird comfort.

Chickens were weighted, evaluated for body conditional score and submitted to necropsy at 45 days of age. Slaughter was carried out by cervical dislocation, according to the ethical guidelines of the Embrapa Swine and Poultry Ethics Committee on Animal Utilization, under the protocol number 011/2011, following the

international guidelines for animal welfare. At the time of sample collection, femurs were classified by presence or absence of BCO according Wideman et al., 2012. Femoral samples, specifically from growing plate, were collected from 10 healthy chickens (control group) and from 10 chickens presenting the first stage of femur necrosis (case group). Samples were placed in microcentrifuge tubes, stored in liquid nitrogen and then transferred to -80°C freezer until the RNA extraction.

4.3.2 RNA extraction and cDNA synthesis

Frozen tissues (-80 °C) were grinded in a mortar containing liquid nitrogen, and 100 mg from femoral head tissue was mixed to 1 mL of Trizol© (Invitrogen) reagent for total RNA isolation. Briefly, after incubate the homogenized sample for 5 minutes at room temperature (RT), 200 µL of chloroform were added and then samples were shaken vigorously. Samples were centrifuged at $12000 \times g$ for 15 minutes at 4°C to phase separation. RNA in the aqueous phase was collected and precipitated with 1 volume of 100% isopropanol, incubated at room temperature for 10 minutes and centrifuged at $12000 \times g$ for 10 minutes at 4°C. Then, the RNA pellet was washed using 1 mL of 75% ethanol, followed by centrifuged at $7500 \times g$ for 5 minutes at 4°C. Pellet was dried for 15 minutes at room temperature, and RNA was resuspended in DEPC-treated water.

RNA samples were quantified using a Nanodrop spectrophotometer and those with OD260:OD280 ratio higher than 1.9 were considered for further analyses. The integrity was confirmed in 1.5% agarose gel. Following, the cDNA was synthesized from 3 µg of total RNA using SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix® kit (Life Technologies), following the manufacturer's instructions.

4.3.3 Real time quantitative PCR

The relative expression of 12 candidate genes were evaluated in this study: *SPP1* (protein coding osteopontin), *TNFRSF11B* (osteoprotegerin), *SPARC* (osteonectin), *CALB1* (calbindin 1), *CALM* (Calmodulin 2), *IBSP* (sialoprotein), *COL1A2* (collagen, type I, alpha 2), *BMP2* (bone morphogenetic protein 2), *RANKL* (kappa-B nuclear factor ligand), *SMAD1* (SMAD family member 1), *LEPR* (leptin receptor) and related transcription factor Runt 2 (*RUNX2*). The sequences were obtained from *Gallus gallus* v. 4.0 on Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) and Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) databases. The primers were designed using the primer-BLAST (Ye et al., 2012), in exon-exon junctions in order to avoid DNA amplification (Table 1). Additionally, primer sequences were evaluated for the presence of second structures in the Netprimer software (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Amplification efficiencies were obtained using the LinRegPCR (Ruijter et al., 2009) and specificities were evaluated by melting curve analysis using the program from 70 °C to 95 °C at 0.1 °C/s for all genes studied.

The real time RT-PCR reactions were carried out in 15 µL final volume containing 1X of Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix[®] (2X) (TermoFisher Scientific), 0.133 µL of each primer and 20 ng of cDNA. The analysis was performed in an ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green as fluorescent dye. The cycle threshold (Ct) mean for each sample was obtained and normalized to a reference gene. The *HMBS* (hydroxymethylbilane synthase; Table 1) was the reference gene used, since it

was the most stable gene according *Normfinder* (Andersen et al., 2004), *Genorm* (Vandesompele et al., 2002) and *Bestkeeper* (Pfaffl et al., 2004) software through evaluation of RefFinder online tool (Xie et al., 2012) (data not show).

4.3.4 Data analysis

For the expression analysis, the Ct (threshold cycle) mean was obtained for each sample. The relative quantification was performed using the Relative Expression Software Tool (REST[®]) that uses a mathematic modeling based on PCR efficiencies and Cts variation of experimental groups, and apply the nonparametric statistical test: Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test[®] (Horgan, Rouault, 2000; Pfaffl, Horgan, 2002).

4.3.5 Identification of gene interactions and enrichment analysis

To improve the interpretation of results, Gene interactions was verified in the String database (<http://string-db.org/>). This database allows to obtain the protein-protein interactions, considering physical and functional associations (Szklarczyk et al., 2015). Also, the Panther classification system (<http://pantherdb.org/>) was used to the enrichment analysis, using gene ontology classification system.

4.4 Results

The mRNA expression of all 12 genes studied was obtained from the femur growth plate of 45 days old broilers affected or not by BCO. The *CALB1* gene

presented late expression (Cts > 30), indicating low levels of expression of this candidate gene at this age, in both affected and unaffected chickens (data not shown).

Regarding the differential expression of genes, the *RUNX2* and *SPARC* were downregulated ($p < 0.05$) in the BCO affected group when compared to the control group. These two genes were about four times less expressed in chickens with BCO (Figure 1). For the other 9 genes evaluated, no differential expression was observed (Table 2).

According to the string database, stronger interactions involve *TNFSF11*, *RUNX2*, *SMAD1*, *BMP2*, *CALM* and *SPARC* genes, while *LEPR*, *CALB1* and *IBSP* genes seem to be in different metabolic pathways (Figure 2A). Also, according the evidence of shared functions analysis, the binding functions are predominantly in those genes grouped (Figure 2B and 2C).

The enrichment analysis showed that the 12 genes are involved in more than 23 biological processes including: osteoblast fate commitment, cellular response to BMP stimulus, ossification, transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway, cellular response to growth factor stimulus, response to growth factor, skeletal system development, cellular response to organic substance, cellular response to chemical stimulus, response to organic substance, regulation of multicellular organismal development, regulation of developmental process (Table 3). The molecular functions are mainly binding, transcription factor, receptor and transporter activities (Figure 2C).

4.5 Discussion

Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis is one of main emergent conditions that have been affecting

poultry welfare and production in the last years. Despite the advances in the identification of bacteria species related to this pathology, the genetic mechanisms involved with BCO are unknown. Here, the differential expression of 12 candidate genes functionally important in the bone development and maintenance were described to facilitating the BCO in chickens.

In this study, most of the genes evaluated pointed out a tendency of downregulation ($p > 0.05$) in the BCO affected group when compared to the normal group. Two genes, *RUNX2* and *SPARC*, were downregulated in the BCO animals ($p < 0.05$). The *RUNX2* gene belongs to the *Runt transcription factor family*, being considered one of the most important transcription factor that control osteoblast shape and differentiation (PROVOT; SCHIPANI, 2005; MA et al., 2010). It has been reported that *RUNX2* is expressed since fetal growth plate inducing cell proliferation and being essential to endochondral ossification, especially on chondrocyte maturation and hypertrophy (KARSENTY, 2001). Rats with induced femoral osteonecrosis showed a decline in *RUNX2* expression with ageing (MA et al., 2010). In this work, just one age was evaluated and the same pattern of *RUNX2* expression related to femoral osteonecrosis was observed, being 4-fold less expressed in the BCO affected group. *RUNX2* downregulation can result on blocking of osteoblasts and chondrocytes differentiation and impairing the correct ossification. Furthermore, it has been shown that the expression of *RUNX2* was involved to initiate bone matrix protein-related genes and mineralization in immature mesenchymal cells (FUJITA et al., 2004).

Besides the functions related to osteogenesis, *RUNX2* has also a role related to *VEGF* (vascular endothelial growth factor) pathway and bone

vascularization (ZELZER et al., 2001). Defects on the *RUNX2* can possibly explain a reduced expression of *VEGF*, causing lack of angiogenic processes like blood vessels and extracellular matrix invasion (KWON et al., 2011). Similar results were demonstrated by Kido et al., (2014), which observed tibiae bone problems in mice when *RUNX2* was downregulated. In chickens, the downregulation of FGF (basic fibroblast growth factor), a gene involved in the VEGF-dependent angiogenesis was already associated with BCO, reinforcing the importance of the correct bone vascularization to avoid bone disorders. Hence, it is possible that an absence of *RUNX2* can affect the ossification in chickens in two manners: hindering the osteoblast maturation and reducing vascularization in the femur.

Another downregulated gene related to BCO was the *SPARC*, which is a calcium-binding matricellular glycoprotein, considered one of the leader genes on the osteogenesis process (ORLANDO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). Its function is involved in bone development, repair and tissue remodeling and controlling the adhesion, synthesis and binding collagens type I and other proteins in the bone extracellular matrix (ORLANDO et al., 2013). In the present study, a four-fold decrease of *SPARC* expression was observed in the BCO affected group when compared to non-affected chickens. Several studies have found that this gene could be related to bone diseases (DELANY et al., 2000; SALARI; ABDOLLAHI, 2011; MENDOZA-LONDONO et al., 2015), which reinforces its participation on BCO genesis or development. The decrease in the number of bone cells, bone formation and prevention of the mature collagen formation was found in *SPARC*-null mice (BOSKEY et al., 2003). Besides that, the therapeutic effects of high expression of *SPARC* have been

associated to confer bone strength, since the presence of its product enables the bone calcification on the extracellular matrix (RIBEIRO et al., 2014; PARVANEH et al., 2015). Therefore, reduced expression of *SPARC* could affect bone mineralization and collagen deposition facilitating the presence of BCO in chickens. Carbonare et al. (2015) observed that sickle cell disease mice with severe bone loss and increased bone turnover presented downregulation of *RUNX2* and *SPARC*, upregulation of *RANK* (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B) and *RANKL* (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand). These findings evidenced the importance of the high levels of the *SPARC* product on bone matrix development and to prevent BCO and other locomotor problems in broilers.

Beyond the *SPARC* function on bone remodeling and mineralization, some studies indicate that this gene has pleiotropic effects on angiogenesis VEGF-dependent (CYDZIK et al., 2015). This function still remains to be clarified, but it is believed that *SPARC*, by interacting with VEGF and its receptors, is an essential element to confer proangiogenic (receptor R2) or antiangiogenic (receptor R1) activities (NOZAKI et al., 2006). In most of studies, an antiangiogenic *SPARC* effect by binding in the VEGF factors was shown (BRADSHAW; SAGE, 2001; KATO et al., 2001; CYDZIK et al., 2015). However, in this study, *SPARC* was downregulated in BCO affected animals, which would be compatible with increased vascularization. Probably, in broilers, the *SPARC* role is more related to ossification in this age than its function in the VEGF dependent pathway. The age-dependent *SPARC* expression pattern has been previously described in mice (REED et al., 2005). The *SPARC* production is depending of the equilibrium of

soluble and collagen-bound forms, which can interfere on the VEGF interaction. Also, we evaluated the SPARC mRNA expression, and its function on VEGF pathways might be more effective in post-transcriptional stages. In chickens, additional studies are necessary to understand the role of on vascularization of BCO broilers and at different ages.

Scarce information is available regarding the genetic pathways of the evaluated genes in chickens. Here, a total of 12 functional candidate genes were chosen based on their role in the normal development of bone metabolism. *In silico* analyses of these genes and their biological processes in other species were performed, and a diversity of pathways involved with ossification and other functions were highlighted: the osteoblast fate commitment, cellular response to BMP stimulus, ossification, transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway, cellular response to growth factor stimulus, response to growth factor, skeletal system development and response to organic substance. In mammals, these processes are closely related to endochondral ossification, and the unbalance of the osteoblasts-osteoclasts formation, the lack of matrix metalloproteinase family and blood vessels (MACKIE et al., 2008) can favor the femur head necrosis in chickens. Additionally, it is important to note that some of these processes, for instance, cellular response to growth factors, have been already associated to stress response in humans, and other crucial regulatory processes, like immunological responses, bone fractures and tissue healing (PONIATOWSKI et al., 2015). Hence, the animal homeostasis and welfare could be important issues to avoid the BCO condition in broilers.

Therefore, we provided significant information on how the RUNX2 and SPARC genes influence the bone

metabolism, since in broilers their roles are still not properly settled. Our findings suggest that the downregulation of *RUNX2* and *SPARC* expression could promote the BCO in chickens. It is believed that low levels of *RUNX2* and *SPARC*, as shown in this study, might reduce vascularization and bone mineralization, increasing skeletal problems in broilers. Further studies are needed to specify on which biological phases these gene expression alterations occur and thus help to elucidate BCO pathogenesis.

4.6 References

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, p. 5245-5250. 2004.

BENNETT, a K.; HESTER, P. Y.; SPURLOCK, D. E. M. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer-broiler cross in chickens. **Animal genetics**, v. 37, n. 3, p. 283–6, 2006.

BISHOP, S. C.; FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. A.; FLOCK, D. K.; WHITEHEAD, C. C. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science**, v. 1668, p. 33–40, 2000.

BOSKEY, A. L.; MOORE, D. J.; AMLING, M.; CANALIS, E.; DELANY, A. M. Infrared analysis of the mineral and matrix in bones of osteonectin-null mice and their

wildtype controls. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 6, p. 1005–1011, 2003.

BRADSHAW, A. D.; SAGE, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 9, p. 1049–54, 2001.

CARBONARE, L. D.; MATTE', A.; VALENTI, M. T.; SICILIANO, A.; MORI, A.; SCHWEIGER, V.; ZAMPIERI, G.; PERBELLINI, L.; DE FRANCESCHI, L. Hypoxia-reperfusion affects osteogenic lineage and promotes sickle cell bone disease. **Blood**, v. 126, n. 20, p. 2320–2328, 2015.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: introduction. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 982–984, 2000.

CYDZIK, M.; ABDUL-WAHID, A.; PARK, S.; BOURDEAU, A.; BOWDEN, K.; PRODEUS, A.; KOLLARA, A.; BROWN, T. J.; RINGUETTE, M. J.; GARIEPY, J. Slow binding kinetics of secreted protein, acidic, rich in cysteine-VEGF interaction limit VEGF activation of VEGF receptor 2 and attenuate angiogenesis. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 8, p. 3493–3505, 2015.

DELANY, a. M.; AMLING, M.; PRIEMEL, M.; HOWE, C.; BARON, R.; CANALIS, E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 7, p. 915–923, 2000.

DUNN, I. C.; FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. a.; MORRICE, D.; BURT, D. W.; PREISINGER, R.; WHITEHEAD, C. C. A QTL for osteoporosis detected in an F2 population derived from White Leghorn chicken

lines divergently selected for bone index. **Animal Genetics**, v. 38, n. 1, p. 45–49, 2007.

FORNARI, M. B.; ZANELLA, R.; IBELLI, A. M.; FERNANDES, L. T.; CANTÃO, M. E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J. O. Unraveling the associations of osteoprotegerin gene with production traits in a paternal broiler line. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 682, 2014.

FUJITA, T.; AZUMA, Y.; FUKUYAMA, R.; HATTORI, Y.; YOSHIDA, C.; KOIDA, M.; OGITA, K.; KOMORI, T. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. **The Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 1, p. 85–95, 2004.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed representative 1957 and 1991 broiler diets. **Poultry science**, v. 82, p. 1500–1508, 2003.

JIANG, T.; MANDAL, R. K.; WIDEMAN, R. F.; KHATIWARA, A.; PEVZNER, I.; MIN KWON, Y. Molecular Survey of Bacterial Communities Associated with Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) in Broilers. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0124403, 2015.

JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1458–1471, 2003.

KARSENTY, G. Minireview: Transcriptional control of osteoblast differentiation. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 2731–2733, 2001.

KATO, Y.; LEWALLE, J. M.; BABA, Y.; TSUKUDA, M.; SAKAI, N.; BABA, M.; KOBAYASHI, K.; KOSHIKA, S.; NAGASHIMA, Y.; FRANKENNE, F.; NOËL, A.; FOIDART, J. M.; HATA, R. I. Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 287, n. 2, p. 422–426, 2001.

KIDO, H. W.; BOSSINI, P. S.; TIM, C. R.; PARIZOTTO, N. A.; DA CUNHA, A. F.; MALAVAZI, I.; RENNO, A. C. M. Evaluation of the bone healing process in an experimental tibial bone defect model in ovariectomized rats. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 26, n. 5, p. 473–481, 2014.

KWON, T.-G.; ZHAO, X.; YANG, Q.; LI, Y.; GE, C.; ZHAO, G.; FRANCESCHI, R. T. Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1 α induce vascular endothelial growth factor gene expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p. 3582–3593, 2011.

MA, X.; LIU, Z.; MA, J.; HAN, C.; ZANG, J. Dynamic expression of Runx2, Osterix and AJ18 in the femoral head of steroid-induced osteonecrosis in rats. **Orthopaedic Surgery**, v. 2, n. 4, p. 278–284, 2010.

MACKIE, E. J.; AHMED, Y. A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K.-S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 1, p. 46–62, 2008.

MCNAMEE, P. T.; SMYTH, J. a. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. **Avian**

pathology : journal of the W.V.P.A, v. 29, n. 5, p. 477–495, 2000.

MENDOZA-LONDONO, R.; FAHIMINIYA, S.; MAJEWSKI, J.; TÉTREAU, M.; NADAF, J.; KANNU, P.; SOCHETT, E.; HOWARD, A.; STIMEC, J.; DUPUIS, L.; ROSCHGER, P.; KLAUSHOFER, K.; PALOMO, T.; OUELLET, J.; AL-JALLAD, H.; MORT, J. S.; MOFFATT, P.; BOUDKO, S.; BÄCHINGER, H.-P.; RAUCH, F. Recessive Osteogenesis Imperfecta Caused by Missense Mutations in SPARC. **The American Journal of Human Genetics**, v. 96, n. 6, p. 979–985, 2015.

NOZAKI, M.; SAKURAI, E.; RAISLER, B. J.; BAFFI, J. Z.; WITTA, J.; OGURA, Y.; BREKKEN, R. A.; SAGE, E. H.; AMBATI, B. K.; AMBATI, J. Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 422–429, 2006.

ORLANDO, B.; GIACOMELLI, L.; RICCI, M.; BARONE, A.; COVANI, U. Leader genes in osteogenesis: A theoretical study. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 1, p. 42–49, 2013.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Modelagem por compartimentos para integrar e comunicar conhecimento em nutrição. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 305–313, 2007.

PARVANEH, K.; EBRAHIMI, M.; SABRAN, M. R.; KARIMI, G.; HWEI, A. N. M.; ABDUL-MAJEED, 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.

PONIATOWSKI, Ł. A.; WOJDASIEWICZ, P.; GASIK, R.; SZUKIEWICZ, D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 137823, 2015.

PROVOT, S.; SCHIPANI, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 3, p. 658–665, 2005.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 1024–1032, 2000.

REED, M. J.; BRADSHAW, a D.; SHAW, M.; SADOUN, E.; HAN, N.; FERARA, N.; FUNK, S.; PUOLAKKAINEN, P.; SAGE, E. H. Enhanced angiogenesis characteristic of SPARC-null mice disappears with age. **Journal of cellular physiology**, v. 204, n. 3, p. 800–7, 2005.

RIBEIRO, N.; SOUSA, S. R.; BREKKEN, R. a.; MONTEIRO, F. J. Role of sparc in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 1, p. 17–26, 2014.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. 45–45, 2009.

SALARI, P.; ABDOLLAHI, M. A comprehensive review of the shared roles of inflammatory cytokines in

osteoporosis and cardiovascular diseases as two common old people problem; actions toward development of new drugs. **International journal of pharmacology**, v.7, n. 5, p. 552-567, 2011.

SCHREIWEIS, M. a; HESTER, P. Y.; MOODY, D. E. Identification of quantitative trait loci associated with bone traits and body weight in an F2 resource population of chickens. **Genetics, selection, evolution : GSE**, v. 37, n. 7, p. 677–698, 2005.

WIDEMAN, R. F.; HAMAL, K. R.; STARK, J. M.; BLANKENSHIP, J.; LESTER, H.; MITCHELL, K. N.; LORENZONI, G.; PEVZNER, I. A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: Evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. **Poultry Science**, v. 91, p. 870–883, 2012.

WIDEMAN, R. F.; PRISBY, R. 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**, v. 3, n. JAN, p. 1–14, 2013.

WISE, K. S. The anatomy of the metacarpo-phalangeal joints, with observations of the aetiology of ulnar drift. **The Journal of bone and joint surgery**, v. 57, n. 4, p. 485–490, 1975.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BioMed Central Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZELZER, E.; GLOTZER, D. J.; HARTMANN, C.;

THOMAS, D.; FUKAI, N.; SOKER, S.; OLSEN, B. R. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1 / Runx2. **Mechanisms of Development**, v. 106, p. 97–106, 2001.

ZHANG, H.; ZHANG, Y. D.; WANG, S. Z.; LIU, X. F.; ZHANG, Q.; TANG, Z. Q.; LI, H. Detection and fine mapping of quantitative trait loci for bone traits on chicken chromosome one. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 127, n. 6, p. 462–468, 2010.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C. M.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. III. Skeletal Integrity. **Poultry Science**, v. 85, n. 10, p. 1700–1711, 2007.

Table 1. Primers sequences, Genbank accession number, Ensembl ID and amplicon sizes

Gene	Primer (5'-3')	Amplicon Size (bp)	Ensembl ID	Accession number
<i>TNFRSF11B</i>	F: 5'-ACGCTTGTGCTCTTGGACAT-3'	193	ENSGALG00000016114	NM_001033641.1
	R: 5'-CAGCGTAGTACTGGTCTGGG-3'			
<i>RUNX2</i>	F: 5'-GATTACAGACCCCAGGCAGG-3'	75	ENSGALG00000026484	NM_204128.1
	R: 5'-TGGCTCAAGTAGGACGGGA-3'			
<i>CALB1</i>	F: 5'-GGCAGGCTTGGACTTAACAC-3'	143	ENSGALG00000015914	NM_205513.1
	R: 5'-GCTGCTGGCACCTAAAGAAC-3'			
<i>SMAD1</i>	F: 5'-GTTTGTAAAGGGTTGGGAGC-3'	174	ENSGALG00000009977	NM_001201455.1
	R: 5'-AATGCAGGAGCTTGGGACCTTA-3'			
<i>HMBS</i>	F: 5'-ACTAGTTCACCTTCGGCAGC-3'	188	ENSGALG00000000291	XM_417846.3
	R: 5'-CTCAGGAGCTGACCTATGCG-3'			
<i>SPP1</i>	F: 5'-GAAAAATACGACCCAGGAG-3'	105	ENSGALG00000010926	NM_204535.4
	R: 5'-TGAAGCCAGGTCACTCTGTG-3'			
<i>SPARC</i>	F: 5'-GTATGAGCGCGATGAGGACA-3'	214	ENSGALG00000004184	NM_204410.1
	R: 5'-GTGGGACAGGTACCCATCAA-3'			
<i>CALM2</i>	F: 5'-CCACCATGGCTGATCAACTG-3'	191	ENSGALG00000010023	NM_205005.1
	R: 5'-GCCATTGCCATCAGCGCTCA-3'			
<i>IBSP</i>	F: 5'-CATCGCTACAAGGGCAGTGA-3'	100	ENSGALG00000010928	NM_205162.1
	R: 5'-CTGCTGCCCTGAGTACCTGC-3'			
<i>COL1A2</i>	F: 5'-TAAGGGTGAAATCGGACCTG-3'	88	ENSGALG00000009641	NM_001079714.2
	R: 5'-ACCACTGGGAACGAGGAAGTC-3'			
<i>BMP2</i>	F: 5'-AGCTTCCACCACGAAGAAGT-3'	172	ENSGALG00000008830	NM_204358.1
	R: 5'-GGTAGCTGCTGTTGCTCTCA-3'			
<i>RANKL/TNFSF11</i>	F: 5'-GACACGCCCTTTGAAAAATCAGG-3'	100	ENSGALG000000026163	NM_001083361.1
	R: 5'-TACGCTGGACTTCCTCTGC-3'			
<i>LEPR</i>	F: 5'-TGGTTTCGCACCGAAGAATG-3'	135	ENSGALG00000011058	NM_204323.1
	R: 5'-TTGCTTCAGGGTGCTTGACA-3'			

Figure 1. Ratio of gene expression in femur between affected and control group, normalized by the reference gene *HMBS*. *p<0.05

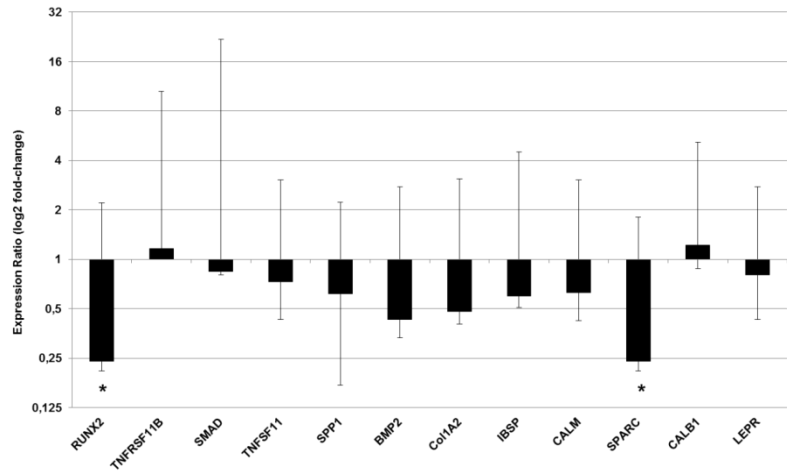


Table 2. Relative gene expression (fold change) for all genes studied between affected and control groups

Gene	Expression Ratio	Std. Error	p-value
<i>RUNX2</i>	0.239	0.031 - 1.958	0.047
<i>TNFRSF11B</i>	1.163	0.109 - 9.403	0.847
<i>SMAD1</i>	0.844	0.039 - 21.059	0.841
<i>RANKL</i>	0.727	0.299 - 2.314	0.493
<i>SPP1</i>	0.617	0.446 - 1.615	0.478
<i>BMP2</i>	0.43	0.098 - 2.321	0.194
<i>COL1A2</i>	0.482	0.079 - 2.615	0.299
<i>IBSP</i>	0.596	0.089 - 3.902	0.463
<i>CALM</i>	0.627	0.205 - 2.416	0.41
<i>SPARC</i>	0.239	0.031 - 1.559	0.03
<i>LEPR</i>	0.8	0.37 - 1.97	0.47
<i>CALB1</i>	1.222	0.341 - 3.933	0.677

Figure 2. Gene network among all genes evaluated. Circles represent genes and connecting lines represent interactions between genes, according the active prediction methods of Stringdb (homology, textmining, databases, experiments, coexpression, cooccurrence, gene fusion or neighborhood)

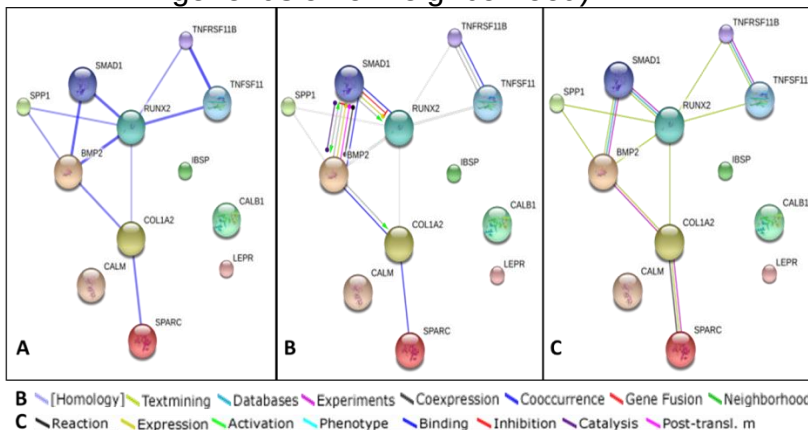


Table 3. Gene Ontology of biological processes overrepresentation test obtained according the Pantherdb

GO biological process complete	Number of genes of <i>G. gallus</i>	Number of genes analyzed	P-value
Osteoblast fate commitment	3	2	1.16E-02
Cellular response to BMP stimulus	59	3	4.94E-02
Ossification	162	6	3.08E-06
Transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	120	4	6.23E-03
Cellular response to growth factor stimulus	225	6	2.17E-05
Response to growth factor	232	6	2.61E-05
Skeletal system development	328	5	9.56E-03
Cellular response to organic substance	844	9	1.08E-06
Cellular response to chemical stimulus	1044	10	1.01E-07
Response to organic substance	1117	10	1.98E-07
Regulation of multicellular organismal development	993	7	6.15E-03
Response to chemical	1570	10	5.78E-06
Organ development	1688	10	1.18E-05
Regulation of developmental process	1351	7	4.87E-02
System development	2280	10	2.30E-04
Multicellular organismal development	2498	10	5.66E-04
Anatomical structure development	2717	10	1.29E-03
Cellular response to stimulus	3223	11	1.58E-04
Single-organism developmental process	2971	10	3.10E-03
Developmental process	2993	10	3.33E-03
Single-multicellular organism process	3202	10	6.45E-03
Multicellular organismal process	3311	10	8.94E-03
Response to stimulus	3957	11	1.51E-03

5 Considerações Finais

Neste trabalho verificou-se que as aves de postura da linhagem controle de 65 semanas de idade tiveram maior expressão dos 11 genes estudados quando comparado com as aves da linhagem selecionada. Dessa forma, podemos supor que as aves da linhagem controle tem melhor regeneração óssea do que a linhagem selecionada, sendo que as aves da linhagem selecionadas estão predispostas a terem mais problemas de integridade óssea na tíbia do que as da linhagem controle.

Já as aves de corte analisadas não seguiram um padrão entre diferenças de expressão dos genes, entre a linhagem selecionada e a linhagem controle. Entretanto três dos dez genes estudados foram mais expressos nas aves controle de 42 dias de idade do que nas aves selecionadas. Já nas aves selecionadas, os três genes que se apresentaram mais expressos na idade de 21 dias, diminuíram sua expressão aos 42 dias de idade, igualando à expressão das aves da linhagem controle, sendo que os genes *RUNX2* e *SPARC* (dois destes três genes) tiveram uma expressão menor na linhagem selecionada do que na linhagem controle nas aves de 42 dias, todavia, não significativa.

Quando analisamos as aves comerciais, com o fêmur afetado por condronecrose bacteriana com osteomielite (BCO) e com o fêmur sem alterações (controle), observamos que as aves com o fêmur afetado têm quatro vezes menos expressão desses dois genes que as aves controle. Assim, podemos concluir que estes genes estão relacionados aos problemas locomotores das aves, que a seleção para características de interesse nestas linhagens melhoradas analisadas neste estudo também selecionaram alelos

(dos genes analisados) que predispõem a problemas locomotores e que, particularmente, o grau de expressão dos genes *RUNX2* e *SPARC* apresentam indícios de estar diretamente relacionado à sanidade do fêmur.

6 Referências

ABE, H.; MATSUBARA, T.; IEHARA, N.; NAGAI, K.; TAKAHASHI, T.; ARAI, H.; KITA, T.; DOI, T. Type IV Collagen Is Transcriptionally Regulated by Smad1 under Advanced Glycation End Product (AGE) Stimulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 14201–14206, 2004.

ABPA. **RELATÓRIO ANUAL DE ATIVIDADES 2014 União Brasileira de Avicultura**. 2015. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>.

AIRAKSINEN, M. S.; EILERS, J.; GARASCHUK, O.; THOENEN, H.; KONNERTH, a; MEYER, M. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1488–1493, 1997.

ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo : aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191–198, 2006.

BENNETT, a K.; HESTER, P. Y.; SPURLOCK, D. E. M. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer-broiler cross in chickens. **Animal genetics**, v. 37, n. 3, p. 283–6, 2006.

BISHOP, S. C.; FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. A.; FLOCK, D. K.; WHITEHEAD, C. C. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens.

British Poultry Science, v. 1668, p. 33–40, 2000.

BOULEFTOUR, W.; BOUDIFFA, M.; WADE-GUEYE, N. M.; BOUËT, G.; CARDELLI, M.; LAROCHE, N.; VANDEN-BOSSCHE, A.; THOMAS, M.; BONNELYE, E.; AUBIN, J. E.; VICO, L.; LAFAGE-PROUST, M. H.; MALAVAL, L. Skeletal development of mice lacking bone sialoprotein (BSP)--impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass. **Plos one**, v. 9, n. 5, p. e95144–e95144, 2014.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–146, 2008.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 17, n. 4, p. 484–492, 2003.

BRADSHAW, A. D.; SAGE, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 9, p. 1049–54, 2001.

BREKKEN, R. A.; SAGE, E. H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 19, n. 8, p. 816–27, jan. 2001.

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.

BROWN, L. F.; BERSE, B.; VAN DE WATER, L.; PAPADOPOULOS-SERGIU, A.; PERRUZZI, C. A.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, H. F.; SENGHER, D. R. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Molecular biology of the cell**, v. 3, n. 10, p. 1169–1180, 1992.

BUWAY, N.; SAROSI, I.; DUNSTAN, C. R.; MORONY, S.; TARPLEY, J.; CAPPARELLI, C.; SCULLY, S.; TAN, H. L.; XU, W.; LACEY, D. L.; BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes & Development**, v. 12, p. 1260–1268, 1998.

BUDGE, K. L.; SILVERSIDES, F. G. Bone breakage in three strains of end-of-lay hens. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 745–747, 2004.

BURT, D. W.; KINGDOM, U. Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. March, p. 5–14, 2002.

CARLETON, S. M.; MCBRIDE, D. J.; CARSON, W. L.; HUNTINGTON, C. E.; TWENTER, K. L.; ROLWES, K. M.; WINKELMANN, C. T.; MORRIS, J. S.; TAYLOR, J. F.; PHILLIPS, C. L. Role of Genetic Background in Determining Phenotypic Severity Throughout Postnatal Development and at Peak Bone Mass in Col1a2 Deficient Mice (oim). **Bone**, v. 42, n. 4, p. 681–694, 2009.

CHAUDHURY, S.; NAG, T. C.; WADHWA, S. Calbindin D-28K and parvalbumin expression in embryonic chick hippocampus is enhanced by prenatal auditory stimulation. **Brain Research**, v. 1191, p. 96–106, 2008.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: introduction. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 982–984, 2000.

DENG, F. Y.; LIU, M. Y.; LI, M. X.; LEI, S. F.; QIN, Y. J.; ZHOU, Q.; LIU, Y. J.; DENG, H. W. 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.

DIEFENDERFER, D. L.; OSYCKA, A. M.; GARINO, J. P.; LEBOY, P. S. Regulation of BMP-Induced Transcription in Cultured Human Bone Marrow Stromal Cells David. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 15, n. 10, p. 1203–1214, 2003.

DUNN, I. C.; FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. a.; MORRICE, D.; BURT, D. W.; PREISINGER, R.; WHITEHEAD, C. C. A QTL for osteoporosis detected in an F2 population derived from White Leghorn chicken lines divergently selected for bone index. **Animal Genetics**, v. 38, n. 1, p. 45–49, 2007.

EIVERS, E.; FUENTEALBA, L. C.; DE ROBERTIS, E. M. Integrating positional information at the level of Smad1/5/8. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 4, p. 304–10, 2008.

FAWC. **Annual review** Farma Animal Welfare Council. 2004.

FORNARI, M. B.; ZANELLA, R.; IBELLI, A. M.; FERNANDES, L. T.; CANTÃO, M. E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J. O. Unraveling the associations of osteoprotegerin gene with production traits in a paternal broiler line. **Springer Plus**, v. 3, n. 1,

p. 682, 2014.

GANSS, B.; KIM, R. H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 10, p. 79–98, 1999.

GRUENDLER, C.; LIN, Y.; FARLEY, J.; WANG, T. Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46533–43, 2001.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed representative 1957 and 1991 broiler diets. **Poultry science**, v. 82, p. 1500–1508, 2003.

HINCKE, M. T.; CHIEN, Y.-C.; GERSTENFELD, L. C.; MCKEE, M. D. Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, n. 5, p. 467–476, 2008.

IBELLI, A. M. G.; PEIXOTO, J. O.; MARCHESI, J. A. P.; COUTINHO, L. L.; LEDUR, M. C. New Insights on the Influence of Leptin Receptor Gene in Bone Traits in Broilers. In: Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, **Anais...**2014.

ISHIJIMA, B. M.; RITTLING, S. R.; YAMASHITA, T.; TSUJI, K.; KUROSAWA, H.; NIFUJI, A.; DENHARDT, D. T.; NODA, M. Enhancement of Osteoclastic Bone Resorption and Suppression of Osteoblastic Bone Formation in Response to Reduced Mechanical Stress Do Not Occur in the Absence of Osteopontin. **Mechanical Stress Requires Osteopontin to Regulate Bone Metabolism**, v. 193, n. 3, p. 3–8, 2001.

JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1458–1471, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia basica**. 10^a. ed. 2004.

KEARNS, A. E.; KHOSLA, S.; KOSTENUK, P. J. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 155–192, 2008.

KNOWLES, T. G.; KESTIN, S. C.; HASLAM, S. M.; BROWN, S. N.; GREEN, L. E.; BUTTERWORTH, A.; POPE, S. J.; PFEIFFER, D.; NICOL, C. J. Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. 1545, 2008.

KOMORI, T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. **Osteoimmunology**, v. 658, p. 43–49, 2010.

LECANDA, F.; TOWLER, D. a; ZIAMBARAS, K.; CHENG, S. L.; KOVAL, M.; STEINBERG, T. H.; CIVITELLI, R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. **Molecular biology of the cell**, v. 9, n. 8, p. 2249–2258, 1998.

LEDUR, M. C.; FIGUEIREDO, E. a P.; SCHMIDT, G. S.; AVILA, V. S.; PEIXOTO, J. O. O MELHORAMENTO GENÉTICO DE AVES NO BRASIL E AS CONTRIBUIÇÕES DA EMBRAPA SUÍNOS E AVES. In: SOUZA, J. C. P. V. B.; TALAMINI, D. J. D.; SCHEUERMANN, G. N.; SCHMIDT, G. S. (Ed.). **Sonho, Desafio e Tecnologia - 35 Anos de Contribuições da**

Embrapa Suínos e Aves. 1. ed. p. 293–316. 2011

LI, H.; DEEB, N.; ZHOU, H.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Chicken Quantitative Trait Loci for Growth and Body Composition Associated with Transforming Growth Factor- β Genes 1. **Poultry Science**, p. 347–356. 2002.

LIAN, J. B.; STEIN, G. S. The Cells Of Bone. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. (Ed.). **Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications**. 2^a. ed. p. 221–322. 2006.

LYONS, K. M.; PELTON, R. W.; HOGAN, B. L. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). **The Company of Biologists Limited**, v. 109, n. 4, p. 833–44, 1990.

MALAVAL, L.; WADE-GUEYE, N. M.; BOUDIFFA, M.; FEI, J.; ZIRNGIBL, R.; CHEN, F.; LAROCHE, N.; ROUX, J.-P.; BURT-PICHAT, B.; DUBOEUF, F.; BOIVIN, G.; JURDIC, P.; LAFAGE-PROUST, M.-H.; AMEDEE, J.; VICO, L.; ROSSANT, J.; AUBIN, J. E. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1145–1153, 2008.

MANN, K. The chicken egg white proteome. **Proteomics**, v. 7, n. 19, p. 3558–3568, 2007.

MARGOLISA, D. S.; KIMB, D.; SZIVEKA, J. A.; LAIB, L.-W.; LIEN, Y.-H. H. Functionally improved bone in Calbindin-D28k knockout mice. **NIH Public Access**, v. 39, n. 3, p. 477–484, 2006.

MAZZUCO, H. **Avaliação da Mineralização Óssea e Qualidade da Casca em Poedeiras Comerciais Submetidas a um Programa Alternativo de Muda Induzida.** 2006.

MCNAMEE, P. T.; SMYTH, J. a. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 29, n. 5, p. 477–495, 2000.

MOTOTANI, H.; IIDA, A.; NAKAMURA, Y.; IKEGAWA, S. Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 28, n. 5, p. 547–53, 2010.

MURRY, C. E.; GIACHELLI, C. M.; SCHWARTZ, S. M.; VRACKO, R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 6, p. 1450–62, 1994.

NONES, K. **Mapeamento de qtls no cromossomo 1 de gallus gallus que influenciam características de desempenho e carcaça.** 2004.

NUNOMURA, W.; TAKAKUWA, Y.; PARRA, M.; CONBOY, J. G.; MOHANDAS, N. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent Calmodulin Binding Sites in Erythrocyte Protein 4.1.: IMPLICATIONS FOR REGULATION OF PROTEIN 4.1 INTERACTIONS WITH TRANSMEMBRANE PROTEINS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6360–6367, 2000.

O'REGAN, A.; BERMAN, J. S. Osteopontin: A key cytokine in cell-mediated and granulomatous

inflammation. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 6, p. 373–390, 2000.

PEIXOTO, J. de O.; TESSMANN, A. L.; SAATKAMP, M. G.; MUNARI, D. P.; LEDUR, M. C. População referência para validação de estudos genômicos e descoberta de genes em frango de corte. **Anais...** p. 1–3, 2011.

PESESSE, L.; SANCHEZ, C.; WALSH, D. a.; DELCOUR, J. P.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P.; HENROTIN, Y. Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 4, p. 547–556, 2014.

PIZAURO JUNIOR, J.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 169–185, 2002.

PRAUL, C. a; FORD, B. C.; GAY, C. V; PINES, M.; LEACH, R. M. Gene expression and tibial dyschondroplasia. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 1009–1013, 2000.

QUINN, A. D.; KETTLEWELL, P. J.; MITCHELL, M. A.; KNOWLES, T. Air movement and the thermal microclimates observed in poultry lairages. **British poultry science**, v. 39, n. 4, p. 469–76, set. 1998.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 1024–1032, 2000.

RIBEIRO, N.; SOUSA, S. R.; BREKKEN, R. a.; MONTEIRO, F. J. Role of sparcs in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. **Journal of Cellular**

Biochemistry, v. 115, n. 1, p. 17–26, 2014.

RUBIN, C. **Functional genomics of bone metabolism**. 2008.

SAMBASIVARAO, S. V. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

SCHREIWEIS, M. a; HESTER, P. Y.; MOODY, D. E. Identification of quantitative trait loci associated with bone traits and body weight in an F2 resource population of chickens. **Genetics, selection, evolution : GSE**, v. 37, n. 7, p. 677–698, 2005.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LÜTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, a; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell press**, v. 89, n. 2, p. 309–319, 1997.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEEL, D. OSTEOPONTIN. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 3, n. i, p. 279–303, 2000.

SOUZA, A. F. G. O. de S. Tecido ósseo em frangos de corte. **Revista eletrônica nutritime**. 2012.

SOUZA, C. G. de; VENTURINI, G. C.; GRUPIONI, N. V.; PEIXOTO, J. de O.; LEDUR, M. C.; MUNARI, D. P.

Variabilidade genética do peso corporal e integridade óssea da tíbia em uma linhagem paterna de frangos de corte. p. 2014–2016, 2015.

STEIN, J. P.; MUNJAAL, R. P.; LAGACE, L.; LAI, E. C.; O'MALLEY, B. W.; MEANS, a R. Tissue-specific expression of a chicken calmodulin pseudogene lacking intervening sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 21, p. 6485–9, 1983.

SULLIVAN, T. W. Skeletal Problems in Poultry: Estimated Annual Cost and Descriptions. **Poultry Science**, v. 73, p. 879–882, 1994.

UBA. **Protocolo de bem-estar para aves poedeiras**. v. 1. 2008a

UBA. **Protocolo de bem-estar para frangos e perus**. 2008b

USUI, M.; XING, L.; DRISSI, H.; ZUSCIK, M.; O'KEEFE, R.; CHEN, D.; BOYCE, B. F. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. **Journal of bone and mineral research**, v. 23, n. 3, p. 314–325, 2008.

VELLEMAN, S. G. The role of the extracellular matrix in skeletal development. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 985–989, 2000.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–422, 1999.

WANG, M.; JIN, H.; TANG, D.; HUANG, S. Smad1 plays an essential role in bone development and postnatal bone formation. **Osteoarthritis Cartilage** v. 19, n. 6, p. 751–762, 2011.

WEBSTER, a B. Welfare implications of avian osteoporosis. **Poultry Science**, v. 83, n. 2, p. 184–192, 2004.

WHITEHEAD, C. C.; FLEMING, R. H. Osteoporosis in cage layers. **Poultry Science**, v. 79, n. 7, p. 1033–1041, 2000.

WIDEMAN, R. F.; PRISBY, R. 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**, v. 3, n. JAN, p. 1–14, 2013.

WISE, K. S. The anatomy of the metacarpo-phalangeal joints, with observations of the aetiology of ulnar drift. **The Journal of bone and joint surgery**, v. 57, n. 4, p. 485–490, 1975.

WOZNEY, J. M. The Potential Role of Bone Morphogenetic proteins in Periodontal Reconstruction. **Journal of Peiriodont**, v. 66, n. 6, p. 506–510, 1995.

YANG, X.; MENG, X.; SU, X.; MAUCHLEY, D. C.; AO, L.; CLEVELAND, J. C.; FULLERTON, D. A. Bone morphogenic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 138, n. 4, p. 1008–15, 2009.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; MOCHIZUKI, S.-I.; YANO, K.; FUJISE, N.; SATO, Y.; GOTO, M.; YAMAGUCHI, K.; KURIYAMA, M.; KANNO, T.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K. Identity of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A Mechanism by which OPG / OCIF Inhibits Osteoclastogenesis in Vitro.

Endocrinology, v. 139, n. 3, p. 1329–1337, 2016.

YE, X. L.; LU, C. F. Association of polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes with inflammatory mediators in patients with osteoporosis. **Endocrine**, v. 44, p. 481–488, 2013.

ZHOU, B. O.; YUE, R.; MURPHY, M. M.; PEYER, J.; MORRISON, S. J. Leptin Receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C. M.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. III. Skeletal Integrity. **Poultry Science**, v. 85, n. 10, p. 1700–1711, 2007.

ZHOU, X.; TAN, F. K.; REVEILLE, J. D.; WALLIS, D.; MILEWICZ, D. M.; AHN, C.; WANG, A.; ARNETT, F. C. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 11, p. 2990–2999, 2002.