



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS NO TRANSCRIPTOMA DO
FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS
E AFETADOS COM CONDRONECROSE
BACTERIANA COM OSTEOMIELEITE**

BRUNA PETRY

CHAPECÓ, 2017

BRUNA PETRY

**VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO
TRANSCRIPTOMA DO FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE
NORMAIS E AFETADOS COM CONDRONECROSE BACTERIANA
COM OSTEOMIELO**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado do Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, Área de Concentração
Ciência e Produção Animal, da Universidade
do Estado de Santa Catarina (UDESC),
como requisito parcial para obtenção de grau
de **Mestre em Zootecnia**

Orientadora: **Dr^a Mônica Corrêa Ledur**

Co-orientadores: Dr^a Jane de Oliveira Peixoto
Dr Diego de Córdova Cucco

Chapecó, SC, Brasil

2017

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

Petry, Bruna

VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO
TRANSCRIPTOMA DO FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS
E AFETADOS COM CONDRONECROSE BACTERIANA COM
OSTEOMIELOITE / Bruna Petry. - Chapecó , 2017.
65 p.

Orientadora: Mônica Corrêa Ledur

Co-orientador: Jane Oliveira Peixoto

Co-orientador: Diego Córdova Cucco

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Chapecó, 2017.

1. BCO. 2. Degeneração Femoral. 3. Necrose da
Cabeça do Fêmur. 4. qPCR. I. Corrêa Ledur , Mônica .
II. Oliveira Peixoto, Jane. Córdova Cucco,
Diego.III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

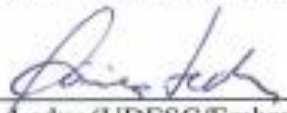
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO
TRANSCRIPTOMA DO FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE
NORMAIS E AFETADOS COM CONDRONECROSE BACTERIANA
COM OSTEOMIELITE**

Elaborada por
Bruna Petry

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:


Dra Mônica Corrêa Ledur (UDESC/Embrapa Suínos e Aves)


Dra Aline Zampar (UDESC)


Dra Adriana Mércia Guirratini Ibelli (Embrapa Suínos e Aves)

Chapecó, 01 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Meus pais, Ivanier Petry e Marlizi Massing Petry, por sempre me apoiarem e não medirem esforços para que eu seguisse os meus sonhos! Amo vocês!

Meus orientadores, Dra Mônica Corrêa Ledur, Dra Jane de Oliveira Peixoto e Dr Diego de Córdova Cucco, por todo o conhecimento que me repassaram.

Equipe do Laboratório de Genética e Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves, pelo companheirismo e pela boa convivência, dentre eles o bolsista Igor Savoldi por toda a ajuda oferecida durante o experimento no laboratório.

Às doutoras Adriana Mércia Guaratini Ibelli e Ediane Paludo, pelo incentivo e auxílio no decorrer da dissertação.

Minha amiga, companheira, ex-orientadora, segunda mãe: Dra Fernanda Maurer D'Agostini, por sempre me apoiar, incentivar e nunca medir esforços para me ajudar!

Aos amigos Karina Mateus, Moisés Rodrigues, Marinara Machado, Suelen Marques, Loivani Venturin por estarem do meu lado nos momentos difíceis, me apoiando a cada etapa do Mestrado.

Aos meus ex-colegas de graduação, amigos incomparáveis, os quais mesmo longe nunca deixaram de me apoiar, Morgana, Juliana, Andressa, Francieli, Aline, Tailine, Gisele e Jean.

Ao Grupo de Melhoramento Genético (GMG) da UDESC Chapecó, pela amizade, bom convívio e aprendizado.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado, meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO TRANSCRIPTOMA DO FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS COM CONDRONECROSE BACTERIANA COM OSTEOMIELE

AUTOR: Bruna Petry
ORIENTADORA: Mônica Corrêa Ledur
Chapecó, 1º de fevereiro de 2017.

Os problemas locomotores apresentam grande impacto na avicultura mundial, uma vez que a dificuldade de locomoção está relacionada à diminuição do desempenho do animal e descarte parcial ou total das carcaças nos abatedouros, causando perdas econômicas, além de afetar o bem-estar das aves. A Condronecrose Bacteriana com Osteomielite (BCO) ou Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF) é responsável por alterar o tecido ósseo, degenerando a cartilagem e a epífise femoral. Apesar da etiologia ainda pouco conhecida, acredita-se que essa enfermidade cause diminuição na vascularização tecidual, interferindo no fluxo sanguíneo e afetando os processos de angiogênese, predispondo as aves a problemas ósseos. Com o intuito de investigar os genes relacionados ao metabolismo ósseo que possam ser importantes para a BCO, objetivou-se validar genes previamente identificados como diferencialmente expressos no transcriptoma do fêmur de frangos de corte normais e afetados com BCO. Para isso, foram selecionados 13 genes com expressão diferencial no estudo prévio de RNA-Seq para validação pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). O RNA total de 20 amostras de frangos (10 normais e 10 afetados com BCO) da linhagem COBB® 500 foi extraído utilizando reagente Trizol®. A síntese de cDNA foi gerada utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Inc) e os *primers* para todos os genes foram desenhados a partir de sequências do genoma do *Gallus gallus*, provenientes do GenBank e Ensembl, pelo programa *Primer-Blast*. Para as análises de qPCR foi utilizado o método de quantificação relativa com sistema de detecção SYBR® Green e os genes constitutivos utilizados foram o *RPL4* (*Ribosomal Protein L4*) e o *RPL30* (*Ribosomal Protein L30*). A análise estatística foi realizada utilizando o programa REST (*Relative Expression Software Tool*). Dos 13 genes estudados, 10 foram validados por qPCR: *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *GFRa2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP*, *ANGPTL7*, *COL8A1* e *SLC30A10*, sendo menos expressos em frangos de corte afetados por BCO do que em frangos normais, com exceção do *SLC30A10*, que apresentou maior expressão em frangos com BCO. Os genes que apresentaram maior razão de expressão entre os grupos foram o *COL8A1*, *SFRP5* e o *ANGPTL7*, sendo, respectivamente, 14,7, 14,9 e 15,6 vezes menos expressos nos frangos afetados com BCO. Dessa forma, os 10 genes validados estão associados com a manifestação da BCO em frangos de corte e podem ser utilizados em estudos posteriores que visem a redução dessa anomalia óssea em frangos de corte.

Palavras-chave: BCO. Degeneração femoral. Necrose da cabeça do fêmur. qPCR.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

VALIDATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN THE FEMUR TRANSCRIPTOME OF NORMAL AND AFFECTED BROILERS WITH BACTERIAL CHONDRONECROSIS WITH OSTEOMYELITIS

AUTHOR: Bruna Petry
ADVISER: Mônica Corrêa Ledur
Chapecó, February 1st, 2017.

Locomotor problems have a great economic impact on world poultry production, since the difficulty of locomotion is related to a decrease in animal performance and partial or total discarding of carcasses in slaughterhouses, besides affecting the chicken welfare. Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) or Femur Head Necrosis (FHN) is responsible for altering the bone tissue, degenerates the cartilage and the femoral epiphysis. Despite the etiology not yet well unknown, it is believed that this disorder causes a decrease in tissue vascularization, interfering with blood flow and affecting angiogenesis processes, predisposing broilers to bone problems. In order to investigate genes related to bone metabolism that may be important for this disorder, we aimed to validate genes previously identified as differentially expressed in the femur transcriptome of normal broilers affected with BCO. For this, 13 genes with differential expression were selected in the previous study of RNA-seq for validation by the real-time PCR technique (qPCR). The total RNA of 20 chicken samples (10 normal and 10 affected with BCO) of the COBB® 500 commercial line was extracted using Trizol® reagent. cDNA synthesis was generated using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen, Inc.) and the primers for all genes were drawn from genome sequences from *Gallus gallus*, obtained in GenBank and Ensembl, by the Primer-Blast program. For the analysis of qPCR, the relative quantification method with SYBR® Green detection system was used and the constitutive genes used were *RPL4* (Ribosomal Protein L4) and *RPL30* (Ribosomal Protein L30). Statistical analysis was performed using the REST program (Relative Expression Software Tool). Of the 13 genes studied, 10 were validated by qPCR: *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *GFR α 2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP*, *ANGPTL7*, *COL8A1* and *SLC30A10*, being downregulated in broilers affected by BCO, except for the *SLC30A10*, which was upregulated in the affected chickens. The genes with the highest expression ratio among the groups were *COL8A1*, *SFRP5* and *ANGPTL7*, respectively, being 14.7, 14.9 and 15.6 times less expressed in broilers affected with BCO. Thus, the 10 validated genes are associated with the manifestation of BCO in broiler chickens and can be used in further studies aiming to reduce this bone anomaly in broilers.

Keywords: BCO. Femoral Degeneration. Femoral Head Necrosis. qPCR.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	7
	REVISÃO DE LITERATURA	7
1.1	Avicultura.....	7
1.2	Problemas locomotores	8
1.3	Ossificação	8
1.4	Condronecrose Bacteriana com Osteomielite	9
1.5	Genes candidatos associados ao metabolismo ósseo	11
1.5.1	Angiopoietin-like 7 (ANGPTL7)	12
1.5.2	ABI family, member 3 NESH binding protein (ABI3BP)	13
1.5.3	Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5)	13
1.5.4	GDNF family receptor alpha 2 (GFRα2)	14
1.5.5	Elastin (ELN)	14
1.5.6	Collagen, type XIV, alpha 1 (COL14A1)	14
1.5.7	Paired Related Homeobox 1 (PRRX1)	15
1.5.8	Adiponectina (ADIPOQ)	16
1.5.9	Angiopoietin-like 5 (ANGPTL5)	16
1.5.10	STEAP Family Member 4 (STEAP4)	17
1.5.11	Solute Carrier Family 30, Member 10 (SLC30A10)	17
1.5.12	Collagen, type VIII, alpha 1 (COL8A1)	17
1.5.13	Interferon, Alpha-inducible Protein 6 (IFI6)	18
1.6	Análise de expressão gênica	18
1.7	Genes constitutivos	19
1.8	Objetivos	20
1.8.1	Objetivo Geral	20
1.8.2	Objetivos Específicos.....	20
2	CAPÍTULO II	21
2.1	MANUSCRITO I.....	22
	VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO TRANSCRIPTOMA DO FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS COM CONDRONECROSE BACTERIANA COM OSTEOMIELEITE.....	22
	RESUMO.....	23
	ABSTRACT.....	24
	INTRODUÇÃO	25
	MATERIAL E MÉTODOS	25
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS.....	35
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51

1 CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Avicultura

A avicultura brasileira ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de exportação e o segundo lugar na produção de carne de frango (UBABEF, 2015; SNA, 2016) e, dentro do setor agropecuário, é uma das atividades que mais vem se destacando, principalmente pelo fato da produtividade da carne de frango ter aumentado significativamente após o melhoramento genético ocorrido (SOUZA, 2012).

De acordo com dados do Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (2015), cerca de 32,3% da produção de carne de frango brasileira é destinada à exportação e cerca de 67,7% se mantém no mercado interno. Do percentual destinado à exportação, o estado do Paraná, no ano de 2014, ficou em primeiro lugar, exportando cerca de 32,21%, enquanto o estado de Santa Catarina ficou na segunda posição, com 24,45% (ABPA, 2015).

O aumento significativo da produção e exportação da carne de frango se deve a melhorias na nutrição, controle de patógenos, bem como o desenvolvimento de pesquisas que visem aumentar o bem-estar e melhorar geneticamente os frangos (COOK, 2000). Esse melhoramento genético, ocorrido nos últimos anos, teve como consequência frangos híbridos com maior produção de carne, provenientes do cruzamento entre linhagens selecionadas para as características de crescimento rápido, eficiência alimentar e rendimento de carcaça (PEIXOTO et al., 2015).

O avanço rápido das técnicas de melhoramento genético e seleção para características de interesse econômico trouxe benefícios à indústria avícola, proporcionando rápido crescimento do frango em um curto espaço de tempo. Em contrapartida, como consequência desse rápido crescimento corporal, houve um aumento dos problemas locomotores, ocasionando perdas econômicas significativas para a avicultura (BARBOSA, 2005). Com o rápido aumento da musculatura na carcaça e o fato do tecido ósseo não conseguir acompanhar esse desenvolvimento (MENDES et al., 2012), as deformidades ósseas vêm se tornando cada vez mais frequentes e os frangos que

chegam ao abatedouro comprometidos com lesões acabam sendo parcialmente descartados (SILVA et al., 2001) causando prejuízos à indústria avícola.

1.2 Problemas locomotores

Os problemas locomotores apresentam grande impacto na avicultura mundial, uma vez que a dificuldade de locomoção está relacionada à diminuição do desempenho do animal e descarte parcial ou total das carcaças nos abatedouros, causando perdas econômicas (BERNARDI, 2011). Em 2012, esses problemas já afetavam cerca de 1,5% dos frangos abatidos nos Estados Unidos (WIDEMAN et al., 2012). As doenças que acometem o sistema locomotor das aves podem estar relacionadas a inúmeros fatores como alojamento inadequado, deficiências nutricionais, ingestão de micotoxinas e problemas genéticos, comprometendo o bem-estar das aves portadoras dessas enfermidades e, em alguns casos, levando-as a morte precoce (BERNARDI, 2011; COOK, 2000; FORNARI et al., 2014). Existem várias doenças que ocasionam desordem locomotora nos frangos de corte, dentre elas estão a discondroplasia tibial, distorções nos ossos longos, condrodistrofia e a Necrose de Cabeça do Fêmur (NCF) ou Condronecrose Bacteriana com Osteomielite (BCO) (COOK, 2000), importante anomalia óssea que será abordada neste estudo.

1.3 Ossificação

O tecido ósseo é formado por três tipos celulares principais: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são importantes na formação da matriz orgânica do osso e na sua mineralização. Estes funcionam como receptores para diversos hormônios como da tireóide, estrogênios, glicocorticóides, insulina e vitamina D3 (1,25 Dihidroxitamina D3) (CERRI, 2005). Além disso, os osteoblastos secretam fatores de regulação como Interleucinas e Fatores de Crescimento (TGF) que atuam na ação e diferenciação osteoblástica, podendo sofrer morte celular como consequência de traumas mecânicos ou de deficiência de estrogênio (ANDIA et al., 2006; MACKIE, 2003).

Os osteócitos são osteoblastos que, com a formação da matriz orgânica, apresentam uma diminuição na quantidade de organelas. Este é o tipo celular mais importante, pois

está presente em maior quantidade nos ossos já formados, sendo essenciais para a manutenção e remodelação de células ósseas, além de atuarem na homeostase mineral óssea em resposta a mudanças mecânicas e de micro ambientes (ANDIA et al., 2006; KERSCHITZKI et al., 2012). Outro tipo de células ósseas importante são os osteoclastos, que são essenciais na fisiologia do esqueleto. Anormalidades no seu desenvolvimento ou função limitam a capacidade de reabsorção óssea, promovendo a desmineralização e degradação da matriz óssea, sendo capazes de digerir as células após o processo de apoptose (ANDIA et al., 2006; SOYSA et al., 2012).

A matriz óssea é constituída basicamente por componentes inorgânicos (69%), como hidroxiapatita, e componentes orgânicos (22%), como colágeno, proteínas estruturais não colágenas e sialoproteínas (KINI; NANDEESH, 2012). Os componentes funcionais dos ossos incluem os fatores de crescimento e as citocinas. A rigidez óssea se deve a presença de minerais, como a hidroxiapatita cristalina, fósforo e cálcio. Além disso, hormônios como a vitamina D3 e Hormônio Paratireoideano são importantes mediadores na regulação de cálcio e a deficiência desses dois elementos causa deficiência mineral óssea (KIM; NANDEESH, 2012).

Existem importantes vias que participam de processos essenciais na formação e homeostase óssea. As WNTs são vias de sinalização que já foram descritas como associadas a processos do desenvolvimento esquelético e sua sinalização anormal já foi associada com defeitos esqueléticos em humanos. Ainda em humanos, essas vias foram identificadas como importantes na formação óssea embrionária, pós-natal e homeostase. A modulação dessas vias vem sendo utilizadas como terapias para tratamento de osteoporose e cicatrização de fraturas (REGARD et al., 2012).

1.4 Condronecrose Bacteriana com Osteomielite

Sabe-se que a taxa de crescimento ósseo é muito mais lenta que a taxa de crescimento muscular e esse é um dos principais motivos pelo qual as aves estão sofrendo com os problemas locomotores. A seleção para rápido crescimento e deposição de musculatura na carcaça levou a um rápido aumento da musculatura, principalmente do peito e coxas, e a estrutura óssea dos membros locomotores não foi capaz de acompanhar essa evolução, não suportando o peso do animal (APPLEGATE; LILBURN, 2002).

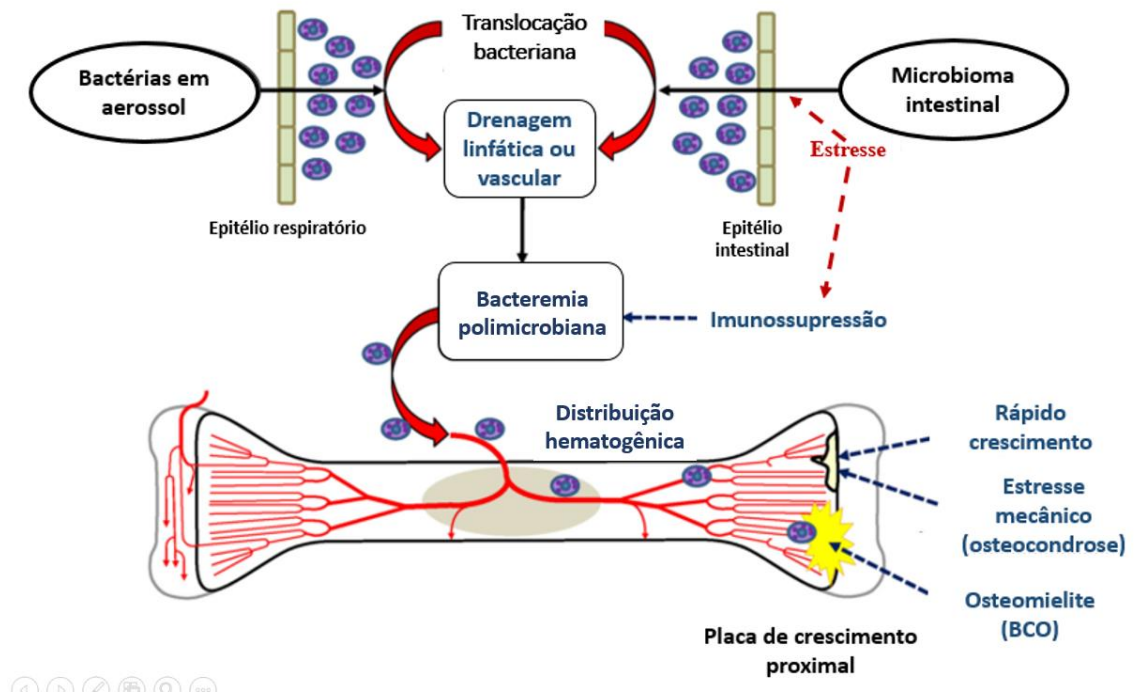
A Degeneração Femoral, Condroncrose Bacteriana com Osteomielite (BCO; do inglês: *Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis*) (JIANG et al., 2015) ou Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF), como é popularmente chamada, é uma doença óssea com etiologia pouco conhecida e que vem afetando consideravelmente a produção avícola. Pesquisas recentes associam esta condição com a ação de microrganismos patogênicos, deficiências na nutrição ou ainda a problemas genéticos (SOUZA, 2012; MCNAMEE; SMYTH, 2000) e, apesar da importância econômica desta anomalia, a atuação dos genes no metabolismo ósseo é algo que precisa ser melhor investigado.

A BCO é responsável por alterar o tecido ósseo, degenerando a cartilagem e a epífise femoral (ALMEIDA PAZ et al., 2009). Diversas bactérias já foram isoladas nas lesões na cabeça do fêmur, dentre elas as do gênero *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., e *Escherichia coli* e, devido a esse isolamento bacteriano nas lesões, essa anomalia, anteriormente conhecida como Necrose da Cabeça do Fêmur, passou a ser denominada de Condroncrose Bacteriana com Osteomielite (JIANG et al., 2015). Aves com essa disfunção possuem problemas sérios de locomoção, com grande dificuldade para caminhar, pois a lesão vai se tornando mais severa de acordo com o aumento de sua idade (ALVES et al., 2013). Como consequência, não são capazes de se aproximar dos comedouros e bebedouros, ficando desidratadas e com fome (MCNAMEE; SMYTH, 2000). Acredita-se que essa enfermidade diminua a vascularização do tecido, impedindo o fluxo sanguíneo e interferindo diretamente nos processos de angiogênese, acarretando a morte tecidual da epífise femoral (WIDEMAN; PRISBY, 2013).

Tal enfermidade inicia-se com um pequeno trauma nas células cartilaginosas, oriundos da desmineralização óssea devido ao rápido crescimento celular e ao estresse mecânico, seguida pela colonização de bactérias oportunistas vindas do trato gastrointestinal. Estas são capazes de se infiltrarem na corrente sanguínea dos frangos, disseminando-se, e saindo através de capilares fenestrados que formam a placa de crescimento, como ilustrado na Figura 1. O estresse suprime o sistema imunológico e facilita a translocação dessas bactérias pelo epitélio intestinal (WIDEMAN, 2016). Uma vez que os pequenos traumas cartilaginosos e as fissuras ósseas são infectados, as células de defesa do organismo agem liberando enzimas para eliminar os organismos infecciosos e essas enzimas acabam lisando as células ósseas (JIANG et al., 2015; WIDEMAN et al., 2012). Além disso, a colonização das bactérias acarreta insuficiência do fluxo sanguíneo na placa de crescimento vascular, ocasionando a BCO (WIDEMAN; PRISBY, 2013). Os principais sinais clínicos observados nesse tipo de enfermidade são a claudicação, ou

fraqueza nas pernas, fazendo-as mancar e utilizar as asas como suporte do seu peso (MCNAMEE; SMYTH, 2000).

Figura 1: Esquema representando a infecção dos condrócitos pelas bactérias oportunistas através do trato intestinal.



Fonte: Adaptado de WIDEMAN, R.F. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. **Poultry Science**. p. 328, 2016.

1.5 Genes candidatos associados ao metabolismo ósseo

O estudo de genes candidatos é importante para determinar a associação entre uma variante genética com algum distúrbio e identificar quais os genes responsáveis por essa condição (KWON; GOATE, 2000). Com base na biologia, os genes candidatos são aqueles previamente identificados, que podem possuir ação biológica conhecida ou não, e estão envolvidos com características de desenvolvimento, metabólicas e da biologia do animal (COUTINHO et al., 2010). Para nosso trabalho, os genes candidatos foram selecionados a partir de um estudo precursor de RNA-Seq, em que se apresentaram diferencialmente expressos entre frangos de corte normais e com BCO. Alguns desses genes já possuem função biológica conhecida, mas outros precisam de maiores investigações.

Grande parte das características de produção é considerada como quantitativa e controlada pela ação de vários genes, cada um deles com um pequeno efeito, de forma que as informações moleculares diferenciadas e descobertas em cada gene podem ser utilizadas na seleção genômica em programas de melhoramento genético avícola (LEDUR et al., 2007). De acordo com Peixoto et al. (2010), a utilização de marcadores moleculares é uma importante técnica para implementar informações genômicas que complementem os métodos tradicionais de melhoramento. Para o trabalho em questão, foram selecionados para validação os seguintes genes candidatos, diferencialmente expressos em estudo prévio do transcriptoma de fêmur de frangos de corte, e possivelmente relacionados com a Condronecrose Bacteriana com Osteomielite: *ANGPTL7*, *ABI3BP*, *SFRP5*, *GFR α 2*, *ELN*, *COL14A1*, *PRRX1*, *ADIPOQ*, *ANGPTL5*, *STEAP4*, *SLC30A10*, *COL8a1*, *IFI6*. Dentre esses genes, apenas 3 possuem funções descritas em aves: *COL14A1*, *PRRX1* e *ADIPOQ*.

1.5.1 Angiopoietin-like 7 (*ANGPTL7*)

O gene *Aniopoietin-like 7* está localizado no cromossomo 21 da espécie *Gallus gallus* (NCBI, 2016). Em humanos, esse gene foi descrito como importante marcador de desenvolvimento de células de tendão (JELINSKY et al., 2010), principal atuante na formação de células hematopoiéticas utilizadas em transplantes, e sua menor expressão está relacionada com a diminuição da capacidade de regeneração dessas células sanguíneas e de células tronco progenitoras (XIAO et al., 2015a; XIAO et al., 2015b). Em camundongos, o gene *ANGPTL7* é expresso em células embrionárias, fibroblastos, células do timo, testículos e células sinoviais (KATOH; KATOH, 2006). Em humanos, esse gene codifica uma potente proteína anti-angiogênica que previne a vascularização tecidual, incluindo o tecido ósseo, denominada *Cornea derived transcript 6* (CDT6); ela recebe esse nome pois foi primeiramente caracterizada na camada estromal da córnea (PEEK et al, 1998).

1.5.2 ABI family, member 3 NESH binding protein (*ABI3BP*)

Localizado no cromossomo 1 da galinha (NCBI, 2016), o gene *ABI3BP* pertence à família ABI, membro 3. Em humanos, está envolvido com a organização da matriz extracelular, regulação positiva da adesão célula-substrato e colágeno (ROSE-MARTEL et al., 2015), ainda, é um gene altamente expresso nas cartilagens articulares (IWAMOTO et al., 2013) e estudos indicam que mudanças na sua expressão podem desempenhar papel crítico em doenças degenerativas como osteocondropatias crônicas (ZHANG et al., 2014). Ainda em humanos, a proteína codificada por esse gene, *ABI3BP*, é necessária para a mudança da proliferação, coordenando a diferenciação de células tronco mesenquimais (HODGKINSON et al., 2013) e está envolvida com a expressão do pericôndrio, ligamentos e tendões, indicando uma relação estrutural entre esses tecidos (BANDYOPADHYAY et al., 2008).

1.5.3 Secreted frizzled-related protein 5 (*SFRP5*)

Localizado no cromossomo 6 da espécie *Gallus gallus* (NCBI, 2016), o gene *SFRP5* pertence à família SFRP. Essa família, em humanos, é composta por cinco membros (*SFRP1-SFRP5*) e esses são capazes de se ligar às vias de sinalização Wnts antagonistas, interferindo nas interações funcionais entre Wnts e os receptores transmembrana (KIM et al., 2012). As Wnts antagonistas são proteínas envolvidas no desenvolvimento de tecidos e vias de sinalização, desempenhando importante papel na sobrevivência celular e na sinalização durante a embriogênese (KAWAMOTO et al., 2012). O gene *SFRP5* está envolvido com a densidade mineral óssea e o gene *SFRP4* já foi associado como um possível fator de desenvolvimento da osteoporose em mulheres no período pós-menopausa (KIM et al., 2012). O gene *SFRP5* está diretamente relacionado com o desenvolvimento do tecido adiposo e tem sido sugerido como um importante regulador anti-inflamatório, regulando as disfunções metabólicas da inflamação, mostrando efeitos benéficos sobre os distúrbios e síndromes metabólicas em humanos (ANUNCIADO-KOZA et al., 2015; TAN et al., 2014).

1.5.4 GDNF family receptor alpha 2 (*GFRa2*)

Na espécie *Gallus gallus*, o gene *GFRa2* está localizado no cromossomo 22 (NCBI, 2016). Esse gene faz parte da família dos fatores neutróficos derivados da linha das células da glia (*Glial Cell-derived Neurotrophic Factor - GDNF*), importantes fatores de desenvolvimento dos neurônios dopaminérgicos, responsáveis por controlar os movimentos e comportamentos emocionais, além de serem importantes fatores de sobrevivência para os neurônios a partir do período pós-natal, protegendo-os dos efeitos das neurotoxinas (OO et al., 2003; AIRAKSIN; SAARMA, 2002). Estudos recentes associaram genes da família GDNF com a modulação do volume dos fatores de necrose tumorais (TNF) em células do sistema imunológico, a nível pós-traducional em humanos, classificando essa família como importante nos processos de ossificação (VARGAS-LEAL et al., 2015; BARRENSCHEE et al., 2013).

1.5.5 Elastin (*ELN*)

O gene *ELN* está localizado no cromossomo 19 da galinha (NCBI, 2016) e ainda não se sabe sobre sua ação nesta espécie. A elastina, proteína codificada por esse gene, associada ao colágeno e o próprio colágeno são os maiores componentes da matriz extracelular, sendo indicadores do estado fisiológico da matriz extracelular e de patologias (NONAKA et al., 2014). Estes são também responsáveis por garantir sustentação às células e induzi-las a atividades como migração e proliferação celular e síntese proteica. A elastina é uma proteína insolúvel, responsável por constituir as fibras elásticas de alguns tecidos que possuem habilidade de expansão e regressão rápida, como ligamentos e artérias (PÉREZ-RICO et al., 2014).

1.5.6 Collagen, type XIV, alpha 1 (*COL14A1*)

O gene *COL14A1* é um importante formador de colágeno, estando associado a colágenos intersticiais via COL1 e COL2, principais colágenos da matriz óssea. Este gene é capaz de interagir com outras matrizes moleculares e receptores de superfícies celulares (GENECARDS, 2016). O *COL14A1* codifica a cadeia alfa colágeno do tipo XIV e é um

membro da família dos colágenos associados a fibrilas com hélice tripla interrompida (YOUNG et al., 2002). Na espécie *Gallus gallus*, esse gene está localizado no cromossomo 2 (NCBI, 2016).

Os colágenos são capazes de, a partir de conexões interfibrilares, interagir com outras estruturas celulares e extracelulares, além de moléculas de superfície de tendões e outros tecidos, sendo que essas interações podem influenciar na densidade da matriz extracelular (SEPTEMBER et al., 2007). Em estudo realizado por September et al. (2007) foram identificados Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) no gene *COL14A1* e possíveis associações do gene com lesões no tendão de Aquiles em humanos. Em estudo realizado com frangos, o gene *COL14A1* apareceu sendo expresso em tecidos conectivos relativamente densos como a derme, tendões, pericôndrio, perimísio, camada estromal dos pulmões e fígado, bem como nos vasos sanguíneos (CASTAGNOLA et al., 1992). Também em frangos, o gene *COL14A1* foi associado ao desenvolvimento dos tendões, sendo importante na maturação das células de formação das fibrilas (YOUNG et al. 2000).

1.5.7 Paired Related Homeobox 1 (*PRRX1*)

Os genes da família Homeobox participam de diferentes aspectos do desenvolvimento, sendo expressos ao longo do complexo da embriogênese nos padrões específicos mesenquimais (GENECARDS, 2015). O gene *PRRX1* é predominantemente expresso nos membros e arcos viscerais (NOHNO et al., 1993). Em camundongos mutantes para esse gene, foram observados defeitos de elementos esqueléticos derivados de processos maxilares e mandibulares. Além disso, o gene foi encontrado restrito a células mesenquimais de embriões, sendo altamente expresso no músculo esquelético e cardíaco de camundongos adultos (MARTIN et al., 1995).

Na espécie *Gallus gallus*, o gene *PRRX1* está localizado no cromossomo 8 (NCBI, 2016) e foi caracterizado como um gene altamente expresso no pericôndrio e células mesenquimais, sugerindo sua participação na manutenção desses tipos celulares (KURATANI et al., 1994).

1.5.8 Adiponectina (*ADIPOQ*)

Os osteoblastos e adipócitos são derivados das mesmas células tronco, portanto, possuem a mesma origem medular. Muitas adipocinas, como a adiponectina (*ADIPOQ*), estão envolvidas no processo de formação e reabsorção óssea. Exemplo disso foi um estudo realizado por Kim et al. (2014), em humanos, em que o gene *ADIPOQ* esteve associado às fraturas vertebrais e deposição de gordura corporal, indicando uma possível ligação entre doenças como osteoporose e obesidade, uma vez que esse gene é um dos responsáveis por estimular o fator de diferenciação dos osteoclastos (LUO et al., 2006). As adiponectinas estão envolvidas na regulação do metabolismo lipídico, glicose, homeostase energética e nas respostas inflamatórias. Seus receptores, AdipoR1 e AdipoR2, que foram encontrados em osteoblastos e osteoclastos indicam a relação das adiponectinas com o metabolismo ósseo (TIAN; YU, 2015).

Na espécie *Gallus gallus*, o gene *ADIPOQ* está localizado no cromossomo 9 (NCBI, 2016), sendo secretado no tecido adiposo, caracterizando importante função nos metabolismos de lipídios e carboidratos, além de estar envolvido com maior deposição de gordura abdominal (TAHMOONRESPUR et al., 2010) e, segundo Fornari et al. (2014), o *ADIPOQ* é um importante gene de regulação óssea em frangos.

1.5.9 Angiopoietin-like 5 (*ANGPTL5*)

O gene da *Angiopoietin-like 5* está localizado no cromossomo 1 da galinha (NCBI, 2016) e possui relação com a formação das fibronectinas. Em estudos de expressão gênica, observou-se expressão do *ANGPTL5* no coração humano adulto (SANTULLI, 2014). Outros estudos mostram seu papel no aumento do número de células tronco hematopoiéticas e sua participação nas vias de sinalização e expansão das células da medula óssea (HATO et al., 2008; KHOURY et al., 2011; SANTULLI, 2014). Membros da família das angiopoietinas-like constituem papel importante no processo de angiogênese, sendo responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos (SANTULLI, 2014).

1.5.10 STEAP Family Member 4 (*STEAP4*)

O gene *STEAP4* está localizado no cromossomo 2 da galinha (NCBI, 2016). A proteína codificada por esse gene está presente no complexo de Golgi e atua na redução da quantidade de ferro e cobre da célula, além de estar envolvida com o metabolismo de adipócitos (GENECARDS, 2016). O *STEAP4* está relacionado com os níveis de vitamina D, peso corporal e resistência à insulina em humanos (NARVAREZ et al., 2013). Segundo o estudo de Zhou et al. (2013), esse gene é altamente expresso durante a diferenciação dos osteoclastos em humanos, sendo indispensável para o seu desenvolvimento.

1.5.11 Solute Carrier Family 30, Member 10 (*SLC30A10*)

Pouco se sabe sobre a atuação do gene *SLC30A10* no metabolismo ósseo. Estudos recentes com humanos relacionaram a atuação deste gene à ação motora do organismo, sugerindo que mutações em sua estrutura levam à doença de Parkinson (LEYVALLADES et al., 2014). Ainda em humanos, esse gene foi encontrado sendo altamente expresso no fígado e auxilia a controlar os níveis de manganês no organismo (GENECARDS, 2016). Silva et al. (2016) descreveram o *SLC30A10* como um gene altamente expresso no intestino delgado de humanos, sendo responsável pelo controle dos níveis de Zinco, Manganês e Vitamina D, componentes essenciais para o metabolismo ósseo e desenvolvimento cerebral.

Em galinhas, o *SLC30A10* está localizado no cromossomo 3 (NCBI, 2016) e ainda não se sabe sobre sua relação com o metabolismo ósseo nesta espécie.

1.5.12 Collagen, type VIII, alpha 1 (*COL8A1*)

O colágeno tipo VIII é um importante componente da membrana de Descemet, na córnea, e possui dois genes que codificam suas subunidades: o Colágeno VIII A1 (*COL8A1*) e Colágeno VIII A2 (*COL8A2*). Estudos sugerem que variações na sequência do DNA do gene *COL8A1* podem estar associadas a córneas finas em pacientes com glaucoma (DESRONVIL et al., 2010).

Estudos com o tecido ósseo de camundongos já caracterizaram o gene *COL8A1* como altamente expresso em osteoblastos e osteócitos de mamíferos, sendo importantes na remodelação e manutenção da massa óssea (PAIC et al., 2009). Na espécie *Gallus gallus*, o gene *COL8A1* está localizado no cromossomo 1 (NCBI, 2016).

1.5.13 Interferon, Alpha-inducible Protein 6 (*IFI6*)

O gene *IFI6*, também conhecido como *Interferon Stimulated Gene 12 (ISG12)*, é um dos muitos genes induzidos por interferon. A proteína codificada por esse gene pode desempenhar importante papel na regulação da apoptose (GENECARDS, 2016). Localizado no cromossomo 2 da galinha (NCBI, 2016), o gene *IFI6* ainda não tem sua ação estabelecida em aves, mas estudos em humanos indicam que este é responsável por codificar proteínas hidrofóbicas e atuar na caracterização da sinalização intracelular. Além disso, a família dos ISGs é conhecida por gerar diversidade celular e fisiológica, estando associada a mecanismos antivirais, anti-tumorais e de atividades imunomodulatórias (PARKER; PORTER, 2004).

1.6 Análise de expressão gênica

As características de um organismo são determinadas por quais genes são expressos nas células, em determinado momento de sua vida. A análise da expressão gênica vem sendo utilizada para entender diversos processos biológicos e identificar marcadores para diagnóstico como alvos terapêuticos no tratamento de doenças (HU; POLYAK, 2006).

Existem diferentes técnicas para analisar a expressão dos genes, algumas delas são: SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), Microarranjos, qRT-PCR e RNA-seq. A tecnologia SAGE, ou Análise serial da expressão gênica, permite realizar uma análise sem conhecimento prévio das sequências, sendo útil na identificação de novos transcritos ou transcritos que, *a priori*, foram mal caracterizados (HU; POLYAK, 2006). A técnica que utiliza microarranjos para caracterização de expressão gênica faz uma análise simultânea de um grande número de transcritos contidos em um chip (CALSA Jr. et al., 2004). A qRT-PCR, ou PCR quantitativa utilizando Transcriptase Reversa, é um dos métodos mais empregados para avaliar a expressão de genes pontuais, e possui duas

formas de quantificação, a absoluta e a relativa. A quantificação absoluta determina o número absoluto de transcritos de interesse, relacionando o sinal da PCR com uma curva padrão estabelecida. Já a quantificação relativa descreve as mudanças na expressão dos genes em comparação a um grupo controle (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O RNA-seq se caracteriza por ser uma técnica capaz de sequenciar todo o RNA de um organismo ou de determinado tecido, sendo possível analisar o transcriptoma em grande escala e atingir resoluções amplas dos níveis de expressão, dependendo apenas da profundidade do sequenciamento, além de identificar o comprimento exato das sequências dos RNAs analisados (TANG et al., 2010).

1.7 Genes constitutivos

Os genes constitutivos, endógenos ou *housekeeping*, caracterizam-se por serem expressos a todo o momento em determinadas células, apresentando pequena ou nenhuma variação entre diferentes idades e tecidos. Sua utilização em estudos de expressão gênica é importante para controlar a variação na quantidade inicial do material estudado, a qualidade do RNA e as diferenças na síntese de cDNA, avaliando se os resultados encontrados referem-se ou não aos tratamentos estudados (WEI et al., 2014; JOHANSSON et al., 2006). Esses genes, ao serem escolhidos, devem ser testados e sua variação deve ser a menor possível para que sirvam como genes de referência. Os genes que mais cumprem esse requisito são os chamados metabólicos básicos, ou genes de manutenção, que possuem expressão estável para garantir a sobrevivência de determinadas células (THELLIN et al., 1999). Portanto, esses são utilizados fornecendo medidas diretas para a variação estimada da expressão, permitindo analisar os erros sistemáticos induzidos quando se utiliza o gene constitutivo como base (VANDESOMPELE et al., 2002; ANDERSEN et al., 2004; PFAFFL et al., 2004).

Alguns dos genes constitutivos mais utilizados são o *GAPDH*, classificado como importante gene de manutenção dos processos celulares, e o gene da subunidade 18S Ribossomal, presente em todas as células (KOZERA; RAPACZ, 2013). Além desses, os genes *RPL4* e *RPL30* já foram caracterizados como bons genes referência em estudos de PCR em tempo real (qPCR), em que foram utilizados sem nenhuma restrição, para diferentes tecidos (células estimuladas com citocinas, células sob condições hipóxicas, células tratadas com ultravioleta, fármacos ou quimioterápicos) em humanos (JONGE et

al., 2007). Também, o gene *RPL30* foi caracterizado por Yang et al. (2013) como um bom gene constitutivo para estudos de qPCR, tendo sua expressão estável em células de fibroblastos de embriões de frango. Diante desses relatos, estudos de expressão gênica devem sempre conter, em suas análises, a presença e comparação com genes constitutivos, para aumentar o grau de confiabilidade do estudo.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo Geral

Validar genes diferencialmente expressos no transcriptoma do fêmur de frangos de corte normais ou afetados com Condroncrose Bacteriana com Osteomielite.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o nível de expressão de 13 genes candidatos na placa de crescimento do fêmur de frangos de corte aos 35 dias de idade afetados ou não com BCO.
- Analisar a interação entre os genes candidatos avaliados neste estudo.

2 CAPÍTULO II

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação foram apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual será submetido.

2.1 MANUSCRITO I

VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO TRANSCRIPTOMA DO FÊMUR DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS COM CONDRONECROSE BACTERIANA COM OSTEOMIELITE

Autores: Bruna Petry, Igor Ricardo Savoldi, Adriana Mércia Guaratini Ibelli, Ediane Paludo, Jane de Oliveira Peixoto, Diego de Córdova Cucco, Mônica Corrêa Ledur

De acordo com normas para publicação em:
Ciência Rural

Validação de genes diferencialmente expressos no transcriptoma do fêmur de frangos de corte normais e afetados com Condroncrose Bacteriana com Osteomielite

Validation of differentially expressed genes in the femur transcriptome of normal and affected broilers with Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis

Bruna Petry^{I,V}, Igor Ricardo Savoldi^{II}, Adriana Mércia Guaratini Ibelli^{III}, Ediane Paludo^{IV}, Jane de Oliveira Peixoto^{III}, Diego de Córdova Cucco^V, Mônica Corrêa Ledur^{III,V}

RESUMO

A condroncrose bacteriana com osteomielite (BCO), também conhecida como degeneração femoral (DF) ou necrose da cabeça do fêmur (NCF) é uma anomalia óssea com etiologia pouco conhecida e que vem causando severos problemas locomotores em frangos de corte, afetando consideravelmente a indústria avícola. Pesquisas recentes a associam com a ação de microrganismos patogênicos oportunistas, mas acredita-se que exista uma predisposição genética que esteja contribuindo para o aparecimento da necrose tecidual nas aves. Diante disso, o trabalho teve como objetivo validar genes previamente identificados como diferencialmente expressos no transcriptoma do fêmur de frangos de corte normais e afetados com BCO, aos 35 dias de idade. Para isso, foram selecionados 13 genes diferencialmente expressos no estudo prévio de RNA-Seq para validação pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). O RNA total de 20 amostras de frangos (10 normais e 10 afetadas com BCO) da linhagem COBB® 500 foi extraído utilizando reagente Trizol®. A síntese de cDNA foi gerada utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Inc) e os *primers* para os genes foram desenhados a partir de sequências da espécie *Gallus gallus* depositadas no GenBank e Ensembl pelo programa *Primer-Blast*. Para as análises de qPCR foi utilizado o método de quantificação relativa com sistema de detecção SYBR® Green e os genes constitutivos utilizados foram o *RPL4* (*Ribosomal Protein L4*) e o *RPL30* (*Ribosomal Protein L30*). A análise estatística foi realizada utilizando o programa *REST (Relative Expression Software Tool)*. Dos 13 genes estudados, 10 foram validados por qPCR: *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *GFRa2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP*, *ANGPTL7*, *COL8A1* e *SLC30A10*, sendo a

^I Mestranda em Zootecnia, UDESC Oeste, Chapecó-SC. bruuna_petry@yahoo.com.br. Autora para correspondência.

^{II} Graduando em Ciências Biológicas, UnC, Concórdia-SC.

^{III} Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC.

^{IV} Doutora em Ciência Animal, UDESC CAV, Lages-SC.

^V Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC Oeste, Chapecó-SC.

maioria menos expressos em frangos de corte afetados por BCO do que em frangos normais, com exceção do *SLC30A10*. Dessa forma, os 10 genes validados estão associados com a manifestação da BCO em frangos de corte e podem ser utilizados em estudos futuros que visem a redução dessa anomalia óssea em frangos de corte.

Palavras-chave: BCO, Necrose da cabeça do fêmur, Degeneração femoral, qPCR.

ABSTRACT

Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (BCO), also known as femoral degeneration (DF) or femoral head necrosis (FHN) is a bone anomaly with little known etiology that has been causing severe locomotor problems in broilers, considerably affecting the poultry industry. Recent studies associate BCO with the action of pathogenic opportunistic microorganisms, but it is believed that there is a genetic predisposition contributing to the appearance of tissue necrosis in chickens. Therefore, the objective of this study was to validate genes previously identified as differentially expressed in the femur transcriptome of normal and BCO affected broiler chickens at 35 days of age. For this, 13 differential expressed genes were selected in the previous study of RNA-Seq for validation by real-time PCR technique (qPCR). The total RNA from 20 chicken samples (10 normal and 10 affected with BCO) from the COBB® 500 commercial line was extracted using Trizol® reagent. The cDNA synthesis was generated using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen, Inc.) and the primers for the genes were drawn from the *Gallus gallus* sequences obtained in GeneBank and Ensembl by the Primer-Blast program. For the analysis of qPCR, the relative quantification method with SYBR® Green detection system was used and the constitutive genes used were *RPL4* (Ribosomal Protein L4) and *RPL30* (Ribosomal Protein L30). Statistical analysis was performed using the REST program (Relative Expression Software Tool). Of the 13 genes studied, 10 were validated by qPCR: *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *GFR α 2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP*, *ANGPTL7*, *COL8A1* and *SLC30A10*, being downregulated in broilers affected by BCO, except for the *SLC30A10*, which was upregulated in the affected chickens. Thus, the 10 validated genes are associated with the manifestation of BCO in broiler chickens and can be used in further studies aiming to reduce this bone anomaly in broilers.

Keywords: BCO, Femoral Head Necrosis, Femoral Degeneration, qPCR.

1 INTRODUÇÃO

2
3 A Condronecrose Bacteriana com Osteomielite (BCO), também conhecida como
4 Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF) ou degeneração femoral, é um dos principais problemas
5 locomotores em frangos de corte. O rápido crescimento corporal, em um curto intervalo de
6 tempo, fez com que os ossos não suportassem o peso do animal, e sofressem com traumas
7 esqueléticos (WIDEMAN et al., 2014).

8 Lesões como a BCO estão relacionadas a fatores como o estresse fisiológico, levando
9 à imunossupressão e translocação bacteriana do trato gastrointestinal para a corrente
10 sanguínea (WIDEMAN; PRISBY, 2013; WIDEMAN et al., 2014). As consequências dessas
11 lesões osteocondróticas incluem a criação de nichos ideais para a colonização de
12 microrganismos distribuídos hematologicamente (WIDEMAN, 2016). Diversas bactérias
13 oportunistas já foram identificadas nessas lesões: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.,
14 *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (JIANG et al., 2015).

15 Apesar da etiologia ainda pouco conhecida, acredita-se que essa enfermidade cause
16 diminuição na vascularização tecidual, interferindo no fluxo sanguíneo e afetando os
17 processos de angiogênese, prejudicando a cartilagem da epífese femoral (PRISBY et al.,
18 2014). O principal sinal clínico observado é a fraqueza óssea, fazendo com que as aves
19 utilizem suas asas para se apoiarem e suportarem seu peso (MCNAMEE; SMYTH, 2000).

20 De acordo com Wideman (2016), acredita-se que exista uma susceptibilidade genética
21 que esteja predispondo essas aves à BCO, mas isso ainda não é totalmente compreendido.
22 Portanto, este trabalho teve como objetivo validar genes diferencialmente expressos no
23 transcriptoma do fêmur de frangos de corte normais e afetados com Condronecrose
24 Bacteriana com Osteomielite (BCO), aos 35 dias de idade, obtidos a partir de estudo prévio de
25 sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

27 MATERIAL E MÉTODOS

28
29 Animais experimentais e coleta de material biológico

30
31 Neste estudo foram utilizados frangos de corte comerciais machos da linhagem
32 COBB® 500, com 35 dias de idade, provenientes de único galpão de um integrado de uma
33 empresa avícola do município, para garantir semelhantes condições ambientais, nutricionais,

fisiológicas e de manejo. Trinta frangos foram transportados para a Embrapa Suínos e Aves, onde foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os procedimentos indicados pelo comitê de ética desta unidade (CEUA 012/2012, Anexo A). Em seguida, foi realizada a necropsia das aves e avaliação para classificação das aves normais e das que apresentavam grau inicial da necrose da cabeça do fêmur (Figura 2). Para a extração do RNA total foram utilizados 10 frangos identificados com grau leve de BCO e 10 frangos normais. As amostras foram coletadas durante a necropsia e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para que a temperatura ambiente não comprometesse a qualidade do RNA. Após, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética e Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), onde foram armazenadas em Freezer -80°C até que a extração do RNA fosse realizada.

Extração de RNA total

As amostras de tecido ósseo da região proximal da cabeça do fêmur foram maceradas com o auxílio de pistilo em almofariz de porcelana contendo nitrogênio líquido para não descongelar e comprometer a qualidade do RNA. A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante onde, em um microtubo, para cada 100 mg de tecido ósseo foi adicionado 1 mL do reagente Trizol[®], a mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos e incubada à temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos. Após, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos e incubando a amostra a temperatura ambiente por mais 5 minutos. A amostra foi centrifugada a 10.000 g em temperatura de 4°C durante 15 minutos. A seguir, formaram-se duas fases, uma sólida contendo as impurezas e outra aquosa. A fase aquosa foi transferida para um microtubo juntamente com 500 µL de isopropanol. O microtubo foi agitado vigorosamente e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 75% e homogeneizado em agitador de tubos. A amostra foi novamente centrifugada a 10.000 g durante 5 minutos a uma temperatura de 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet secado durante 15 minutos a temperatura ambiente, ressuspensionado em 30 µL de água e aquecido a 55°C durante 10 minutos (REGITANO et al., 2009). Após, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro *BioDrop* considerando a razão OD260:OD280 maior que 1,8.

Síntese de cDNA

O RNA total foi utilizado para a síntese da nova fita de cDNA, que foi gerada utilizando-se o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen®), seguindo o protocolo e especificações do fabricante (Invitrogen®) onde, para cada amostra, em um microtubo, foram acrescentados 4µg de RNA total, *primer* OligoDT a 50µM, *Annealing buffer* e água tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato) (SIGMA®) para completar 10µL de reação. Essas amostras foram incubadas a 65°C durante 5 minutos em termociclador (Applied Biosystems®) e resfriadas em gelo durante 1 minuto. O segundo mix do kit foi preparado adicionando 10µL de 2X *First-Strand Reaction Mix* e 2µL de *SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix* (Life Technologies®) por amostra. Os dois mixes preparados foram misturados em um mesmo microtubo, sendo agitado levemente com as mãos e foi dado um *spin*. As amostras foram incubadas à 50°C por 50 minutos seguido de 85°C durante 5 minutos e armazenadas em gelo até a etapa de PCR.

Seleção de genes candidatos

Os genes analisados nesse estudo foram previamente identificados como diferencialmente expressos no transcriptoma do fêmur utilizando a tecnologia de RNA-Seq em frangos machos normais e afetados com BCO aos 35 dias de idade. Nesse transcriptoma foram observados 11.500 genes expressos, dos quais 153 foram diferencialmente expressos (DE) em frangos com e sem BCO (PEIXOTO et al., 2015). Esse transcriptoma está depositado como *BioProject* acesso PRJNA352962, na base de dados SRA. Para seleção dos genes a serem validados nesse estudo, foram utilizados como critérios o *False Discovery Rate* (FDR<0,05) e o diferencial de expressão *Log2 Fold-Change* (Log2FC>1,0). Dessa forma, 13 genes candidatos foram selecionados para validação com a técnica de PCR em tempo real (qPCR).

PCR Quantitativo

Através do PCR quantitativo (qPCR) estudou-se 13 genes candidatos, previamente caracterizados como DE no transcriptoma do fêmur de frangos de corte, sendo eles: *GFRα2*, *ABI3BP*, *SFRP5*, *ANGPTL7*, *ELN*, *COL14A1*, *PRRX1*, *ADIPOQ*, *ANGPTL5*, *STEAP4*, *SLC30A10*, *COL8A1*, *IFI6*.

Os *primers* para todos os genes foram desenhados em regiões éxon-éxon a partir de sequências do genoma da galinha doméstica (*Gallus gallus*) obtidas do banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), por meio do programa *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Tabela 1). A qualidade dos *primers* foi avaliada utilizando-se a ferramenta *online Netprimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) e o volume de *primer* utilizado para cada gene está descrito na Tabela 2.

Os genes constitutivos selecionados foram analisados através da ferramenta *online RefFinder* (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference&ckattempt=2>), que utiliza um algoritmo capaz de ordenar os genes que possuem menor variação, avaliando-os pelos *softwares Delta CT*, *BestKeeper*, *Normfinder* e *GeNorm*. Esses quatro *softwares* comparam e classificam os genes de referência candidatos a serem estudados e, com base na ordem da classificação, atribuem um valor adequado para cada gene (XIE et al. 2012). Os genes constitutivos utilizados nesse estudo foram o *RPL4* (*Ribosomal Protein L4*) e o *RPL30* (*Ribosomal Protein L30*), com volumes específicos de *primers* (Tabela 2). Esta escolha foi feita a partir da média dos resultados obtidos no *software RefFinder*, sendo que o *RPL4* e o *RPL30* apresentaram como média 1,19 e 1,57, respectivamente. Estudos realizados com esses dois genes já os caracterizaram como sendo bons genes de referência, apresentando boa expressão em diversos tipos de tecidos (FENG et al., 2010; UDDIN et al., 2011).

As análises de qPCR foram realizadas no Laboratório de Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC) e as reações foram realizadas utilizando-se as seguintes condições: *Maxima Master Mix SYBR Green*[®] 2x (Fermentas[®]) na concentração final de 1X; 0,1 a 0,2 uM de cada *primer*; 2µL de cDNA diluído para a concentração de 1:10 e água ultra pura livre de DNase e RNase (*Nuclease Free Water*, Qiagen[®]) para completar o volume da reação de 15 µL.

As análises de expressão foram realizadas pelo método da quantificação relativa, utilizando-se como sistema de detecção o SYBR[®] Green. As reações foram realizadas no equipamento QuantStudio 6 (Applied Biosystems[®]), utilizando-se para todas as amostras, a ciclagem de temperaturas: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguido da análise da Curva de Melting padrão do equipamento. Realizaram-se também cálculos de eficiência da amplificação, e foram feitas diluições seriadas na base 10 para cada *primer* avaliado neste estudo. Para o cálculo da eficiência foi utilizado o método descrito por Pfaffl (2001), sendo considerados para análise os *primers* que tiveram eficiência

de 90 a 100%. Todas as reações foram realizadas em duplicatas, calculando-se a média dos valores do ciclo limiar (*Cycle threshold* – Ct) das duas repetições.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa REST (*Relative Expression Software Tool*), que é um *software* utilizado para análise da expressão gênica relativa, capaz de comparar dois grupos ou condições de tratamentos a partir de um modelo baseado na eficiência do PCR e o desvio médio do ponto entre o grupo amostral (frangos afetados com BCO) e o grupo controle (frangos normais) (REST *software*, 2009).

O modelo matemático utilizado para a obtenção das expressões relativas baseia-se nas eficiências obtidas nas PCRs e nas variações obtidas entre, por exemplo, as amostras do grupo de frangos normais (controle) e do grupo afetado. A expressão é dada pela razão entre as diferenças de média do grupo controle e do grupo afetado dos genes alvo e dos genes referência utilizados, onde Razão é a taxa da expressão relativa, E_{alvo} é a diferença dos transcritos do gene alvo, $E_{\text{referência}}$ é a diferença dos transcritos do gene referência e ΔCt é a variação dos transcritos do Ct controle – Ct alvo, de acordo com a equação abaixo (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002):

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{Média controle} - \text{Média tratamento})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{Média controle} - \text{Média tratamento})}}$$

Os dados de razão de expressão foram submetidos a um teste não paramétrico para obtenção dos níveis de significância (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002) e os valores obtidos foram transformados em escala logarítmica (*Log2 Fold Change*) para que fosse possível observar, numericamente, os genes que tiveram maior ou menor expressão. A fim de explorar melhor os dados, ao final do estudo, uma análise de interação dos genes foi realizada, utilizando-se o *software online* GeneMANIA (<http://genemania.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito dos 13 genes analisados por qPCR apresentaram expressão diferencial significativa entre os grupos de aves normais e afetadas a 5% e 2 a 10% de significância (Figura 3). Dessa forma, 10 dos 13 genes avaliados neste estudo foram validados em relação aos resultados obtidos previamente para esses genes na análise de RNA-Seq, mantendo o

padrão de *up* e *down regulation* entre a análise prévia de RNA-Seq e a quantificação por qPCR. Possivelmente, alguns dos genes não foram validados devido a diferença no número de animais utilizados nas duas técnicas: RNA-Seq (4x4) e qPCR (10x10), às diferenças intrínsecas dos animais, ou também pelas diferenças entre as técnicas. Sabe-se que o sequenciamento de RNA é uma técnica excelente para estudos globais de expressão, contudo não é a mais indicada para se quantificar transcritos. Para isso, utiliza-se a técnica de qPCR, que através de fluorescência faz a leitura dos genes, gerando uma cobertura uniforme dos éxons (WANG et al., 2009), além de que, a utilização do qPCR revela a expressão de genes restritos ou com padrões específicos, os quais o sequenciamento do RNA não detecta. Portanto, utilizar as duas técnicas em conjunto permite uma comparação dos resultados aumentando o grau de confiabilidade do estudo.

Análise da expressão gênica

De acordo com sua expressão relativa, todos os 13 genes foram expressos no tecido do fêmur, sendo que os genes *STEAP4*, *ELN* e *IFI6* não foram detectados como diferencialmente expressos entre os grupos estudados. Já os genes *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *GFRa2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP* e *ANGPTL7* foram menos expressos no grupo afetado em relação ao grupo normal a um nível de 5% de significância, enquanto que os genes *SLC30A10* e *COL8A1* tiveram menor expressão a um nível de 10% de significância (Figura 3 e Tabela 3).

De acordo com a análise de expressão, o gene *ADIPOQ* foi 1,8 vezes menos expresso no grupo afetado ($p=0,048$), comparado ao grupo controle. A adiponectina é secretada a partir do tecido adiposo, em humanos, e sua expressão já foi associada com a formação direta dos osteoblastos e indireta dos osteoclastos, além de estar envolvida no processo de reabsorção óssea (RHIE et al., 2010). Outros estudos com o gene *ADIPOQ* mostraram seu efeito sobre a ação anti-inflamatória (ZHANG et al., 2007; RHIE et al., 2010) e alguns trabalhos o associaram com processos de homeostase da cartilagem, em que foi caracterizado o possível envolvimento da Adiponectina na causa de artrite reumatóide e osteoporose (KOSKINEN et al., 2011; KANG et al., 2010). Em frangos, esse gene aparece como constituinte do tecido adiposo, com importante função no metabolismo de lipídios e carboidratos (TAHMOONRESPUR et al., 2010). Além disso, segundo Fornari et al. (2014) esse gene é um importante regulador ósseo em frangos de corte. Essas informações propõem que a menor expressão desse gene pode influenciar diretamente no aparecimento da BCO, causando degeneração da epífese femoral e da cartilagem de proteção da cabeça do fêmur, interferindo

1 nos processos de regulação óssea, uma vez que o gene aparece associado a doenças ósseas e
2 cartilaginosas.

3 O gene *PRRX1* foi 2,8 vezes menos expresso no grupo afetado ($p=0,005$) com relação
4 ao grupo controle. A diminuição na expressão deste gene pode interferir na renovação óssea,
5 uma vez que ele participa da regulação das células mesenquimais, incluindo a formação dos
6 osteoblastos, atuando na osteogênese (DU et al., 2013). Apesar de ainda não ter sido descrito
7 como contribuinte para a BCO em frangos, o gene já foi descrito como necessário em
8 processos de angiogênese, como na formação de redes vasculares em pulmões de
9 camundongos (IHIDA-STANSBURY, et al., 2004), nos fornecendo importante informação
10 sobre sua participação em processos de formação de vasos sanguíneos e indicando que sua
11 baixa expressão contribui diretamente para a necrose tecidual. Na espécie *Gallus gallus* esse
12 gene teve alta expressão no pericôndrio e células mesenquimais, sugerindo sua participação
13 na manutenção desses tipos celulares (KURATANI et al., 1994). Portanto, níveis baixos na
14 expressão do gene *PRRX1* podem comprometer a regulação da formação óssea, acarretando
15 enfraquecimento do sistema locomotor dos frangos.

16 O gene *ANGPTL5* foi menos expresso nos frangos afetados com BCO e sua regulação
17 ainda não é bem compreendida. HATO et al. (2008) observaram esse gene sendo expresso em
18 células cartilaginosas maduras (condrócitos), indicando a importância do *ANGPTL5* na
19 manutenção dessas células e, uma vez que ocorre diminuição na sua expressão, muitas
20 deformidades e perdas de integridade podem acometer os condrócitos. Essa é uma hipótese
21 que explicaria o fato da sua expressão ter sido 6,1 vezes menor ($p=0,001$) nos frangos
22 afetados por BCO, quando comparado com os frangos normais. Além disso, esse gene não
23 possui ação angiogênica e participa da formação de células mesenquimais, porém possui
24 relação com a produção de células sanguíneas e cordão umbilical em humanos (HATO et al.,
25 2008; SANTULLI, 2014) indicando que sua deficiência pode, além de acometer os
26 condrócitos, interferir na produção e regeneração de células sanguíneas.

27 O gene *GFR α 2* foi 4,8 vezes menos expresso no grupo afetado em relação ao grupo
28 controle ($p=0,001$). Pouco se sabe sobre a ação desse gene no metabolismo ósseo. Sabe-se
29 que ele faz parte da família dos GDNFs (Fatores Neurotróficos Derivados de Gliais) que
30 foram associados com o volume de fatores de necrose tumoral (TNF) em células do sistema
31 imunológico a nível pós-traducional (AIRAKSINEN; SAARMA, 2002), além disso, estudos
32 recentes incizam importante participação de genes dessa família na diferenciação de células
33 mesenquimais ósseas (ZHU et al., 2015), indicando possível influência da baixa expressão do

gene *GFRa2* na formação de necrose femoral dos frangos afetados, como no caso do resultado obtido nesse estudo.

O gene *SFRP5* foi um dos que apresentou a expressão mais reduzida no grupo afetado, sendo 14,9 vezes ($p=0,001$) menos expresso nos frangos com BCO em relação aos frangos normais. Pouco se sabe sobre sua atuação, porém ele já foi descrito como sendo responsável por regular negativamente as vias de sinalização intracelular WNTs. Estas vias estimulam os processos metabólicos importantes, como o influxo de Cálcio (KIKUCHI et al., 2012) afetando a calcificação óssea, tornando os ossos mais susceptíveis à doenças de deformação cartilaginosa, como a BCO. Kwon et al. (2014) estudaram o gene *SFRP5* em pacientes com Artrite Reumatóide (AR) e observaram uma diminuição na sua expressão em relação a indivíduos normais. Além disso, estes autores relataram que o *SFRP5* atua como um regulador negativo da resposta inflamatória dessa enfermidade, tendo importante ação anti-inflamatória.

A expressão do gene *ABI3BP* foi reduzida em 3,9 vezes em frangos com BCO, comparado ao grupo normal ($p=0,007$). Estudo em humanos identificou-o como sendo altamente expresso no pericôndrio, tendões e ligamentos (BANDYOPADHYAY et al., 2008). Ainda em humanos, sua alta expressão foi relacionada à doença de Kashin-Beck, importante osteocondropatia responsável por degenerar a cartilagem e necrosar os condrócitos (MORENO-REYES et al., 1998; ZHANG et al., 2014). Diante desses relatos, sugere-se que a expressão do gene *ABI3BP* esteja envolvida na manutenção da função normal da cartilagem e, tanto sua alta como baixa expressão, podem interferir nas condições normais de formação dos condrócitos.

O *COL14A1* foi 8,69 vezes menos expresso em frangos afetados com BCO ($p<0,001$). Em frangos, esse gene foi encontrado sendo expresso em tecidos conectivos como a derme, tendões, camada estromal e vasos sanguíneos (CASTAGNOLA et al., 1992), também, para essa mesma espécie, a expressão de *COL14A1* foi associada como importante na maturação de células de formação das fibrilas (YOUNG et al., 2000), estando associado com a diferenciação da matriz extracelular e formação de tecidos intersticiais macios (KANNUS et al., 1998; JUST et al., 1991). Muito provavelmente, pela deficiência nessa função, sua expressão reduzida pode estar contribuindo com a formação da Condronecrose Bacteriana com Osteomielite em frangos de corte (Figura 3).

O *ANGPTL7* foi 15,6 vezes menos expresso em frangos com BCO ($p=0,047$) em relação aos normais. Esse é o primeiro relato do envolvimento desse gene com o metabolismo ósseo

em frangos de corte. O silenciamento desse gene em camundongos já foi relacionado com a diminuição da expressão das fibronectinas, alterando a aderência celular, formação de colágenos e miociclinas, e também, com efeito anti-angiogênico, estimulando a proliferação celular e promovendo a vascularização (COMES et al., 2011; PARRI et al., 2014). A superexpressão do *ANGPTL7* é capaz de alterar a expressão de algumas proteínas de matriz extracelular, incluindo as fibronectinas e colágenos tipo I, IV e V (SANTULLI, 2014). Esse relato sugere que sua menor expressão, observada no presente estudo, pode influenciar a formação da matriz extracelular e a produção de colágeno, causando deficiência nas células ósseas e cartilaginosas, sendo um fator agravante na necrose do osso.

O gene *SLC30A10* foi 2,04 vezes mais expresso ($p < 0,10$) nos frangos de corte afetados com BCO quando comparado aos frangos normais. Esse é o primeiro relato da expressão do *SLC30A10* no fêmur de frangos de corte e, comparado ao que já se sabe em humanos, esse gene é importante no metabolismo ósseo, uma vez que já foi descrito como ativador de vitamina D3, Zinco e Manganês, elementos essenciais na composição normal da matriz óssea (SILVA et al., 2016).

Sem conhecimentos prévios sobre a atuação do gene *COL8A1* no metabolismo ósseo de frangos de corte, aqui sua expressão foi 14,7 vezes menor ($p < 0,10$) nos frangos afetados com BCO em relação aos frangos normais. As informações sobre a atuação desse gene são escassas para várias espécies. Em camundongos, um estudo de expressão de genes em células ósseas (osteoblastos e osteócitos) demonstrou alta expressão de *COL8A1* nos osteócitos, que são o componente celular mais abundante nos ossos dos mamíferos, sendo importantes na manutenção e remodelação da massa óssea (PAIC et al., 2009). Essas células coordenam os processos de remodelação realizados pelos osteoblastos e osteoclastos e a baixa expressão do gene *COL8A1* pode contribuir com a deficiência na formação das células ósseas e causar problemas como osteonecrose tecidual e BCO (PAIC et al., 2009).

Análise de interação entre os genes estudados

A fim de conhecer a interação dos genes estudados, realizou-se uma análise através do *software online* GeneMANIA (<http://genemania.org/>) (Figura 4). Esse *software* utiliza como base informações da espécie humana (*Homo sapiens*), uma vez que ainda não existem dados completos registrados da espécie *Gallus gallus* em sua base de dados. Através dele, constatou-se que alguns genes compartilham domínios de proteínas e co-localização, e que a maioria dos genes possuem relação de co-expressão.

A co-expressão é a expressão simultânea que ocorre entre dois ou mais genes, quando os genes são expressos no mesmo momento, em mesmas condições, e um pode interferir na expressão do outro. Essa informação é importante para conhecer e caracterizar a rede de interação molecular, bem como as funções e os significados biológicos dos genes. Neste estudo, foram caracterizados genes com alta ou baixa evidência de co-expressão, que são apresentados na Figura 4A. Quanto mais espessa a linha que indica a ligação, maior é a evidência de co-expressão entre os genes. Na análise, os genes que apresentaram co-expressão com o maior número de genes foram o *PRRX1*, *ADIPOQ*, *COL14A1* e *COL8A1*, interagindo com os genes *GFR α 2*, *ELN*, *ABI3BP*, *SLC30A10* e *ANGPTL7*. Todos esses genes participam da composição da matriz extracelular (NONAKA et al., 2014; PÉREZ-RICO et al., 2014), formação de colágeno e mineralização óssea e cartilaginosa (COAN et al., 2014). O gene *ELN* não foi validado como diferencialmente expresso em nosso estudo, porém, apresentou forte interação de co-expressão com os genes *PRRX1* e *ADIPOQ*, indicando uma possível interferência desses dois genes na expressão no gene da elastina.

Em relação a outras formas de interação, os genes *IFI6* e *STEAP4* apresentam co-localização, sendo expressos no mesmo local (célula ou tecido), e suas funções se relacionam à regulação do metabolismo celular durante a diferenciação dos osteoblastos (ZHOU et al., 2013) e regulação da apoptose (GENECARDS, 2016). Os genes *ADIPOQ* e o *COL8A1*, *ANGPTL5* e *ANGPTL7* compartilham domínios de proteínas (Figura 4B), onde parte da cadeia polipeptídica pode se enovelar e formar uma estrutura compacta e estável, ambos são importantes nos processos de formação e reabsorção óssea (KIM et al., 2014) e vascularização tecidual (SANTULLI, 2014).

As informações referentes a atuação dos 13 genes estudados nas vias metabólicas ósseas ainda são escassas para frangos de corte. Na literatura consta a atuação deles em alguns processos metabólicos em humanos, como na homeostase (TIAN; YU, 2015), na angiogênese (SANTULLI, 2014), participação na organização da matriz extracelular (ROSE-MARTEL et al., 2015) e formação de osteoblastos e osteoclastos (RHIE et al., 2010; COMES et al., 2011). Em frangos de corte, a BCO se inicia a partir de uma fratura na placa de crescimento do fêmur, seguida pela colonização de bactérias oportunistas que chegam até o local por vias hematogênicas (WIDEMAN, 2015). Das bactérias já caracterizadas, a *Staphylococcus aureus* foi descrita por Mcnamee e Smyth (2000) como uma das principais causadoras dessa osteomielite. -

Os genes *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *ANGPTL7*, *GFR α 2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP* e *COL8A1* tiveram sua expressão reduzida nos frangos afetados em comparação com

os normais, enquanto que o gene *SLC30A10* teve maior expressão, confirmando a possível influência desses genes na manifestação da BCO. Dentre eles, o *COL14A1*, *COL8A1*, *SFRP5* e *ANGPTL7* apresentaram maiores diferenças na expressão entre os grupos, sendo, respectivamente, 8,69, 14,7, 14,9 e 15,6 vezes menos expressos no grupo afetado com BCO. Esses quatro genes participam de processos fundamentais de organização e formação das células de colágeno, produção de osteócitos e processo de angiogênese, indicando que alterações nas suas expressões podem afetar diretamente o desenvolvimento ósseo normal, contribuindo com os processos de necrose tecidual e o surgimento de BCO em frangos de corte.

CONCLUSÃO

Os genes *ADIPOQ*, *PRRX1*, *ANGPTL5*, *GFR α 2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP*, *ANGPTL7*, e *COL8A1* foram validados como diferencialmente expressos entre frangos de corte normais e afetados com Condronecrose Bacteriana com Osteomielite, tendo sua expressão significativamente reduzida nas aves afetadas, e o *SLC30A10* apresentou maior expressão nas aves afetadas, confirmando a influência desses genes na manifestação dessa anomalia óssea.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA:

CEUA 02/2012 da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC.

REFERÊNCIAS

- AIRAKSINEN, M.S. & SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **National Review Neuroscience**. v.3, p. 383–394, 2002. Disponível em < <http://www.nature.com/nrn/journal/v3/n5/full/nrn812.html> > Acesso em: 22 mai. 2016. doi: 10.1038/nrn812.
- ATTIVITA, D. & SPORTIVE, M. E. Exercise Associated Factors Affecting Cardiovascular Health and Function. **Myocyte Signaling To Genetic**. 2011. Disponível em < <http://amsdottorato.unibo.it/3949/> > Acesso em: 23 mai. 2016. doi: 10.6092/unibo/amsdottorato/3949.

- 1 BANDYOPADHYAY, A. et al. Identification of unique molecular subdomains in the
2 perichondrium and periosteum and their role in regulating gene expression in the underlying
3 chondrocytes. **Developmental Biology**. v.321, p.162-174, 2008. Disponível em <
4 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2575053/> > Acesso em: 25 set. 2016. doi:
5 10.1016/j.ydbio.2008.06.012.
- 6 CALSA Jr., T. et al. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência &**
7 **Desenvolvimento**. v.33. p.88-100. Julho/Dezembro, 2004. Disponível em <
8 http://www.lge.ibi.unicamp.br/lgeextensao2008/extsup/sage_eg.pdf > Acesso em: 4 dez.
9 2016.
- 10 COAN, H.B. et al. Dermatopontin in the extracellular matrix enhances osteogenic
11 differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. **Musculoskeletal Biology**. v.1.
12 p.1-8, Agosto. 2014. Disponível em < [http://www.hoajonline.com/musculoskeletal/2054-](http://www.hoajonline.com/musculoskeletal/2054-720X/1/2)
13 [720X/1/2](http://www.hoajonline.com/musculoskeletal/2054-720X/1/2)> Acesso em: 6 jan. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.7243/2054-720X-1-2>.
- 14 COMES, N. et al. Evidence for a role of angiopoietin-like 7 (ANGPTL7) in extracellular
15 matrix formation of the human trabecular meshwork: implications for glaucoma. **Genes to**
16 **cell**. v.16. p.243-259, Fevereiro. 2011. Disponível em <
17 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199193> > Acesso em: 26 jan. 2016. doi:
18 10.1111/j.1365-2443.2010.01483.x.
- 19 DU, B. et al. The transcription factor paired-related homeobox 1 (Prrx1) inhibits adipogenesis
20 by activating transforming growth factor- (TGF) signaling. **Journal of Biological Chemistry**,
21 v. 288, n. 5, p. 3036–3047, 2013. Disponível em <
22 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561528/>> Acesso em: 9 jan. 2016. doi:
23 10.1074/jbc.M112.440370.
- 24 FENG, X. et al. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using
25 SYBR green qPCR. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 288–293, 2010. Disponível em:
26 <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2000887&tool=pmcentrez&rend](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2000887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
27 [ertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2000887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract) >. Acesso em: 6 jan. 2016. doi: 10.1186/1471-2199-8-67.
- 28 FORNARI, M. B. et al. Unraveling the associations of osteoprotegerin gene with production
29 traits in a paternal broiler line. Springer Plus, Londres. v.3. p.1-8. Novembro. 2014. Disponível
30 em <<http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-3-682> > Acesso em: 12
31 de Fevereiro de 2017.
- 32 GENE CARDS, Gene *IFI6*. Disponível em < [http://www.genecards.org/cgi-](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFI6&keywords=IFI6)
33 [bin/carddisp.pl?gene=IFI6&keywords=IFI6](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFI6&keywords=IFI6) > Acesso em: 20 out. 2016.

- 1 HATO, T. et al. The role of Angiopoietin-Like Proteins in angiogenesis and metabolism.
2 **TCM.** v.18. no. 1. p. 6-14, Janeiro. 2008. Disponível em <
3 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206803> > Acesso em: 6 jan. 2016. doi:
4 10.1016/j.tcm.2007.10.003.
- 5 IHIDA-STANSBURY, K. et al. Paired-Related Homeobox Gene *Prx1* Is Required for
6 Pulmonary Vascular Development. **Circulation Research.** V.11. p.1507-1514, Abril. 2004.
7 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117820> > Acesso em: 25 jun 2016.
8 doi: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130656.72424.20>.
- 9 JIANG, T. et al. Molecular survey of Bacterial Communities Associated with Bacterial
10 Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) in Broilers. **Plos One.** v.10, Abril. 2015.
11 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881241> > Acesso em: 4 abr. 2016.
12 doi: 10.1371/journal.pone.0124403.
- 13 JOSSE, J. et al. Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in
14 Osteomyelitis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.5. p.1-17, Novembro.
15 2015. Disponível em < [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660271/pdf/fcimb-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660271/pdf/fcimb-05-00085.pdf)
16 [05-00085.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660271/pdf/fcimb-05-00085.pdf)> Acesso em: 22 dez. 2016. doi: 10.3389/fcimb.2015.00085.
- 17 JUST, M. et al. Undulin is a novel member of the fibronectin-tenascin family of extracellular
18 matrix glycoproteins. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 266. n. 26. p 17326-17332,
19 1991. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1716629> > Acesso em: 20
20 nov. 2016.
- 21 KANG, E.H. et al. Adiponectin is a potencial catabolic mediator in osteoarthritis cartilage.
22 **Arthritis Research & Therapy.** V.12. p.231, Dezembro. 2010. Disponível em <
23 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194467>> Acesso em: 20 set. 2016. doi:
24 10.1186/ar3218.
- 25 KANNUS, P. et al. Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in
26 musculoskeletal tissues of rat. **Histochemical Journal**, v.30. p.799-810, Novembro, 1998.
27 Disponível em < <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1003448106673>> Acesso em: 20
28 nov. 2016. doi: 10.1023/A:1003448106673.
- 29 KIKUCHI, A. et al. Wnt5a: its signaling, functions and implication in diseases. **Acta**
30 **Physiologica.** v.204. p.17-33, Janeiro. 2012. Disponível em <
31 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518267>> Acesso em: 20 dez. 2016. doi:
32 10.1111/j.1748-1716.2011.02294.x.
- 33 KIM, H. et al. The association between polymorphisms in Wnt antagonists genes and bone
34 respond to hormone therapy in postmenopausal Koren women. **Menopause: The journal of**

- 1 **The North American Menopause Society.** v. 19. n. 9. p.1008-1014, Setembro. 2012.
- 2 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22668815>> Acesso em: 24 out. 2016.
- 3 doi: 10.1097/gme.0b013e3182503d47..
- 4 KOSKINEN, A. et al. Adiponectin associates with markers of cartilage degradation on
- 5 osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through
- 6 mitogen-activated protein kinase pathways. **Arthritis Research & Therapy.** v.13,
- 7 Novembro. 2011. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334633/>
- 8 > Acesso em: 13 dez. 2016. doi: 10.1186/ar3512.
- 9 KWON, Y.I. et al. Secreted frizzled-related protein 5 suppresses inflammatory response in
- 10 rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through down-regulation of c-Jun N-terminal
- 11 kinase. **Rheumatology.** v.53. p.1704-1711, Abril. 2014. Disponível em <
- 12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/24764263/>> Acesso em: 13 set. 2016. doi:
- 13 10.1093/rheumatology/keu167.
- 14 LIU, Z.; ZHANG, H. Genetic polymorphisms of ADIPOQ and osteonecrosis of the femoral
- 15 head risk in Chinese population. **International Journal of Clinical and Experimental**
- 16 **Pathology.** v.9. p.7763-7768, Agosto. 2016. Disponível em <
- 17 <http://www.ijcep.com/files/ijcep0023220.pdf> > Acesso em: 20 nov. 2016. ISSN:1936-
- 18 2625/IJCEP0023220.
- 19 LU, X. et al. Identification of the Homeobox Protein Prx1 (MHox, Prrx-1) as a Regulator of
- 20 Osterix Expression and Mediator of Tumor Necrosis Factor α Action in Osteoblast
- 21 Differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research.** v.26. p.209-129, Janeiro. 2011.
- 22 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683885>> Acesso em: 14 nov.
- 23 2016. doi: 10.1002/jbmr.203.
- 24 MCNAMEE, P. T.; SMYTH, J. A. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral
- 25 head necrosis') of broiler chickens: a review. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A,** v.
- 26 29, n. 5, p. 477-495, Agosto. 2000. Disponível em <
- 27 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184815>> Acesso em: 13 set. 2016. doi:
- 28 10.1080/03079450050118386.
- 29 MINAŘÍKOVÁ, M. et al. Osteogenic profile of mesenchymal cell populations contributing to
- 30 alveolar bone formation. **Cells Tissues Organs.** v.200.p.339-348, Novembro. 2014.
- 31 Disponível em < <https://www.karger.com/Article/Abstract/439165> > Acesso em: 20 nov.
- 32 2016. doi: 10.1159/000439165.
- 33 MORENO-REYES, R. et al. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to sele-
- 34 nium and iodine status. **The New England Journal of Medicine.** V.339. p.1112-1120,

- 1 Outubro. 1998. Disponível em <
2 <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199810153391604#t=article>> Acesso em: 13 jul.
3 2016. doi: 10.1056/NEJM199810153391604.
- 4 NONAKA, R. et al. Domain 36 of Tropoelastin in Elastic Fiber Formation. **Biological and**
5 **Pharmaceutical Bulletin**. v. 37. n.4, p.698-702, Abril. 2014. Disponível em <
6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694619>> Acesso em: 10 set. 2015. doi:
7 <http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00933>.
- 8 OKAMOTO, O.; FUJIWARA, S. Dermatopontin, a novel player in the biology of the
9 extracellular matrix. **Connective Tissue Research**. v. 47, p.177-189, Fevereiro. 2006.
10 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987749>> Acesso em: 13 jun. 2015.
11 doi: 10.1080/03008200600846564.
- 12 PAIC, F. et al. Identification of Differentially Expressed Genes Between Osteoblasts and
13 Osteocytes. **Bone**. v.45. p. 682-692, Outubro. 2009. Disponível em <
14 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2731004/pdf/nihms125291.pdf> > Acesso em:
15 7 jan. 2017. doi: :10.1016/j.bone.2009.06.010.
- 16 PALUDO, E. et al. The involvement of *RUNX2* and *SPARC* genes in the bacterial
17 chondronecrosis with osteomyelitis in broilers. **Animal**. p.1-8. Novembro. 2016. Disponível
18 em <
19 [https://www.researchgate.net/publication/310806842_The_involvement_of_RUNX2_and_SP](https://www.researchgate.net/publication/310806842_The_involvement_of_RUNX2_and_SPARC_genes_in_the_bacterial_chondronecrosis_with_osteomyelitis_in_broilers)
20 [ARC_genes_in_the_bacterial_chondronecrosis_with_osteomyelitis_in_broilers](https://www.researchgate.net/publication/310806842_The_involvement_of_RUNX2_and_SPARC_genes_in_the_bacterial_chondronecrosis_with_osteomyelitis_in_broilers)> Acesso em:
21 30 nov. 2016. doi: 10.1017/S1751731116002433.
- 22 PARRI, M. et al. Angiopoietin-like 7, a novel pro-angiogenic factor over-expressed in
23 cancer. **Angiogenesis**. v.17. p.881-896, Junho. 2014. Disponível em <
24 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903490>> Acesso em: 20 nov. 2016. doi:
25 10.1007/s10456-014-9435-4.
- 26 PASSARIELLO, C. **Exercise associated factors affecting cardiovascular health and**
27 **function: from myocyte signaling to genetic variations**. 2011. 95f. Dissertação - Dottorato
28 di ricerca in Scienze dello sviluppo e del movimento umano, Alma Mater Studiorum
29 Università di Bologna. Disponível em < <http://amsdottorato.unibo.it/3949/>> Acesso em: 23
30 mai. 2016. doi: 10.6092/unibo/amsdottorato/3949.
- 31 PEIXOTO, J.O. et al. Expressão gênica diferencial envolvida com Condronecrose Bacteriana
32 com Osteomielite em frangos de corte aos 35 dias de idade. 52ª Reunião Anual da Sociedade
33 Brasileira de Zootecnia. Belo Horizonte, MG, 2015. Disponível em <
34 <https://www.embrapa.br/informatica-agropecuaria/busca-de-publicacoes/->

- 1 /publicacao/1024034/expressao-genica-diferencial-envolvida-com-condronecrose-bacteriana-
 2 com-osteomielite-em-frangos-de-corte-com-35-dias-de-idade > Acesso em: 18 set. 2016.
- 3 PÉREZ-RICO, C. et al., Elastin development-associated extracellular matrix constituents of
 4 subepithelial connective tissue in human pterygium. **Anatomy and Pathology/Oncology**. V.
 5 55. n. 10. p.6309-6318, Outubro, 2014. Disponível em <
 6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183766>> Acesso em: 12 jan. 2016. doi:
 7 10.1167/iovs.14-14214.
- 8 PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
 9 **Nucleic Acids Research**. v.29. n.9. p. 2002-2007, Maio. 2001. Disponível em <
 10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886> > Acesso em: 10 jul. 2016. PMCID:
 11 PMC55695.
- 12 PFAFFL, M. W. et al. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison
 13 and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids**
 14 **Research**. V. 30. no. 9. e36, Maio. 2002. Disponível em <
 15 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972351> > Acesso em: 12 jun. 2016. PMCID:
 16 PMC113859.
- 17 PRISBY, R.; MENEZES, T.; CAMPBELL, J.; BENSON, T.; SAMRAJ, E.; PEVZNER, I.;
 18 WIDEMAN, R.F.Jr. Kinetic examination of femoral bone modeling in broilers. **Poultry**
 19 **Science**. V. 93. P. 1122-1129. Maio, 2014. Disponível em <
 20 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24795304>> Acesso em: 14 de fevereiro de 2017. DOI:
 21 10.3382/ps.2013-03778.
- 22 REGITANO, L. C. A. et al. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas a Produção Animal.
 23 São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. 98 p. Disponível em <
 24 <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/46472> > Acesso em: 03 de Junho de 2016.
- 25 REST *software*, 2009. Disponível em < <http://rest.gene-quantification.info/> > Acesso em 08
 26 out. 2015.
- 27 RHIE, Y. J. et al. Effects of body composition, leptin, and adiponectin on bone mineral
 28 density in prepubertal girls. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 8, p. 1187–1190,
 29 Julho. 2010. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908789/> >
 30 Acesso em: 20 out. 2016. doi: 10.3346/jkms.2010.25.8.1187.
- 31 SALMON, C. et al. Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone.
 32 **Journal Proteomics**. v.8. p.544-555, Outubro. 2013. Disponível em <
 33 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24007660>> Acesso em: 13 out. 2016. doi:
 34 10.1016/j.jprot.2013.08.016.

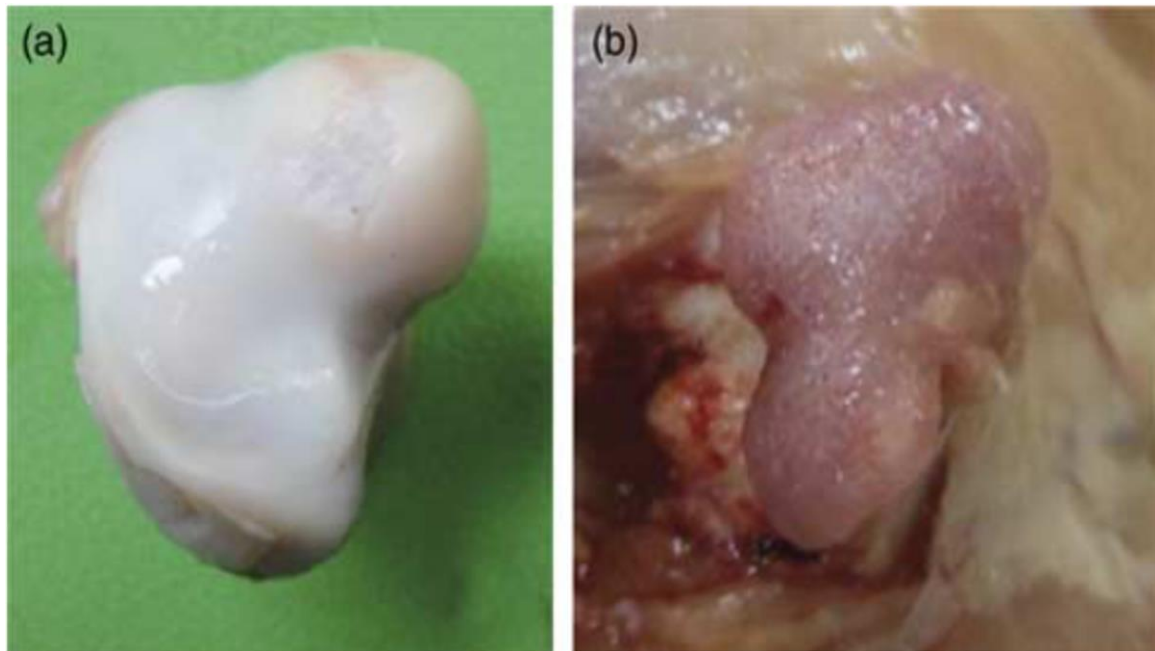
- 1 SANTULI, G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. **Frontiers in**
2 **Endocrinology**. v.23, Jan, 2014. Disponível em <
3 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478758> > Acesso em: 13 jul. 2016. doi:
4 10.3389/fendo.2014.00004.
- 5 SILVA, T.C. et al. Vitamin D3 transactivates the zinc and manganese transporter SLC30A10
6 via the Vitamin D receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**.
7 v.163. p. 77-87, Outubro. 2016. Disponível em
8 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076016301029> > Acesso em: 7 jan.
9 2017. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.04.006.
- 10 SMITH, D.W. Is avascular necrosis of the femoral head the result of inhibition of
11 angiogenesis? **Medicinal Hypotheses**. V.49.p.497-500, Dezembro. 1997. Disponível em <
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466372>> Acesso em: 15 set. 2016. PMID: 9466372.
- 13 TUCKER, K. A. et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse
14 osteoblasts. **FEMS Microbiology Letters**. 186, 151–56. 2000. Disponível em <
15 <http://femsle.oxfordjournals.org/content/186/2/151.long>> Acesso em 22 dez. 2016. doi:
16 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09096.x>
- 17 TAHMOORESPUR, M. et al. Evaluation of adiponectin gene expression in the abdominal
18 adipose tissue of broiler chickens: feed restriction, dietary energy, and protein influences
19 adiponectin messenger ribonucleic acid expression. **Poultry Science**. Reino Unido. v.89,
20 p.2092-2100, Outubro. 2010. Disponível em <
21 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852099>> Acesso em 30 de Maio de 2015.UBABEF,
22 Relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal, 2014. Disponível em <
23 <http://abpa-br.com.br/?m=75&date=2012-04> > Acesso em 10 ago. 2015.
- 24 UDDIN, M. et al. Age-related changes in relative expression stability of commonly used
25 housekeeping genes in selected porcine tissues. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 441,
26 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <[http://www.biomedcentral.com/1756-](http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/441)
27 [0500/4/441](http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/441)>. Acesso em: 16 out. 2016. doi: 10.1186/1756-0500-4-441.
- 28 WANG, Z. et al. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature**
29 **Reviews|Genetics**. v.10. p.57-63. Janeiro. 2009. Disponível em <
30 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015660>> Acesso em: 04 jan. 2016. doi:
31 10.1038/nrg2484.
- 32 WIDAA, A. et al. *Staphylococcus aureus* protein A plays a critical role in mediating bone
33 destruction and bone loss in osteomyelitis. **PLoS ONE**. 2012. Disponível em <

- 1 <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040586>> Acesso em 22 dez.
- 2 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040586>.
- 3 WIDEMAN Jr., R.F. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a
- 4 review. Immunology Special Section. **Poultry Science**. v.95. p.325-344, Fevereiro. 2016.
- 5 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527707> > Acesso em: 12 nov.
- 6 2016. doi: 10.3382/ps/pev320.
- 7 WIDEMAN Jr, R.F. et al. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers: Influence
- 8 of sires and straight-run versus sex-separate rearing. **Poultry Science**. v.93.p.1675-1687,
- 9 Maio. 2014. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812237> > Acesso em:
- 10 10 set. 2016. doi: 10.3382/ps.2014-03912.
- 11 WIDEMAN, R.F.; PRISBY, R.D. Bone circulatory disturbances in the development of
- 12 spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translation model for the
- 13 pathogenesis of femoral head necrosis. **Frontiers in Endocrinology**, v.3. p.1-15, Janeiro.
- 14 2013. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550519/> > Acesso
- 15 em: 20 nov. 2015. doi: 10.3389/fendo.2012.00183.
- 16 XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small
- 17 RNAs. **Plant Molecular Biology**. V.80. p.75-84, Setembro. 2012. Disponível em <
- 18 <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11103-012-9885-2> > Acesso em: 5 jan. 2017.
- 19 doi: 10.1007/s11103-012-9885-2.
- 20 ZHANG, Z. L. et al. Association between SNP and haplotypes in PPARGC1 and adiponectin
- 21 genes and bone mineral density in Chinese nuclear families. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.
- 22 28, n. 2, p. 287–295, Setembro. 2007. Disponível em <
- 23 <http://www.nature.com/aps/journal/v28/n2/full/aps200737a.html> > Acesso em: 10 dez. 2016.
- 24 doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00489.x
- 25 ZHANG, F. et al. Genome-wide copy number variation study and gene expression analysis
- 26 identify ABI3BP as a susceptibility gene for Kashin-Beck disease. **Human Genetics**.
- 27 V.133.p.793-399, Janeiro. 2014. Disponível em <
- 28 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442417>> Acesso em: 10 set. 2016. doi:
- 29 10.1007/s00439-014-1418-4.
- 30 ZHOU, J..et al. STEAP4 Plays a critical role in osteoclastogenesis in vitro by regulating
- 31 cellular Iron/Reactive oxygen species (ROS) levels and cAMP response element-binding
- 32 protein (CREB) activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.30064-30074,
- 33 Outubro. 2013. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990467>> Acesso
- 34 em: 28 ago. 2015. doi: 10.1074/jbc.M113.478750.

1 ZHU, T.; YU, D.; FENG, J.; WU, X.; XIANG, L.; GAO, H.; ZHANG, X.; WEI, M. GDNF
2 and NT-3 induce progenitor bone mesenchymal stem cell differentiation into neurons in fetal
3 gut culture medium. **Cell Molecular Neurobiology**. V.35. p. 255-264, Março. 2015.
4 Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25301495>> Acesso em: 18 de
5 fevereiro de 2017. Doi: 10.1007/s10571-014-0120-3.

6

1



2

3 Figura 2 - Placa de crescimento normal do fêmur (a); primeiro estágio da Condronecrose
4 Bacteriana com Osteomielite na placa de crescimento do fêmur de frangos de corte (b). Fonte:
5 PALUDO, E. et al., 2016.

6

1 Tabela 1 - *Primers* dos genes alvo e genes constitutivos utilizados para a Reação em Cadeia
 2 da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do produto (pb)	Número de acesso no GenBank
<i>SFRP5</i>	F: TGGCAAGTTCCTTCCGAC R: ACCACGAAATCACTGGAGCA	156	XM_421707.3
<i>PRRX1</i>	F: TGGAGCAGCCCATAGTACCT R: ATGGCACTGTAAGGCGAGG	82	NM_001277724.1
<i>ANGPTL-7</i>	F: AGCTACCGTCTGTTTGTGGG R: ACCAATATCCACCTTTGCGG	148	XM_004947467.1
<i>ADIPOQ</i>	F: GAGCCAGGTCTACAAGGTGT R: CTTTCACCCCTTCTGCCCTT	113	NM_206991.1
<i>GFRα2</i>	F: CCCCTGTCTCCGAAATGCTA R: ACCTTGGGCAGCATTGTGA	99	NM_205101.1
<i>COL14A1</i>	F: GTGATGTTGGAGCTCCTGGT R: CACACTTGACGAGCAACAGC	103	NM_205334.1
<i>ELN</i>	F: TGGTGTCCGCGGTGTC R: ACACCGAATTTGGGAGGCTT	123	NM_001293107.1
<i>ABI3BP</i>	F: TGGACCAACAATGCCTGTGA R: CTTGACATGGGGTGCTAGGT	147	XM_015296932.1
<i>IFI6</i>	F: AGAAATGGGTGCCAAAGGCT R: GAACTCCGCCTCCGCAAG	119	NM_001001296.5
<i>ANGPTL-5</i>	F: TCAGGAAACGCAGGTGATGC R: AGTGCACACTGGCCTACATC	111	NM_001197236.1
<i>STEAP4</i>	F: GGAGGTTGAGTGCACAGATGA R: TTGGGAATCAGGCTGGATGG	196	XM_001235256.3
<i>SLC30A10</i>	F: TTGTCGGGATCGTAGGTCTGT R: ATTCACCTGTTTCAGGGTCTCC	102	XM_419410.4
<i>COL8A1</i>	F: ACTCTCCTATTAAGCTGAGGGACC R: CAGGAAAGGGCAGAAGGACA	122	NM_001293134.1
<i>RPL4</i>	F: TGTTTGCCCCAACCAAGACT R: CTCCTCAATGCGGTGACCTT	137	NM_001007479.1
<i>RPL30</i>	F: ATGATTCGGCAAGGCAAAGC R: GTCAGAGTCACCTGGGTCAA	201	NM_001007967.1

3 Legenda: F: Foward (5'-3') R: Reverse (3'-5').

4

- 1 Tabela 2 - Volume de *primer* utilizado para Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
 2 (qPCR) para cada gene.

Genes	Concentração final do <i>primer</i> (mM)	Volume de <i>primer</i> (ng/μL)
<i>RPL4</i>	0,13	1,0
<i>RPL30</i>	0,13	1,0
<i>ADIPOQ</i>	0,20	1,5
<i>PRRX1</i>	0,13	1,0
<i>SLC30A10</i>	0,11	0,8
<i>STEAP4</i>	0,20	1,5
<i>ANGPTL5</i>	0,13	1,0
<i>COL8A1</i>	0,11	0,8
<i>ELN</i>	0,13	1,0
<i>GFRα2</i>	0,11	0,8
<i>IFI6</i>	0,13	1,0
<i>SFRP5</i>	0,11	0,8
<i>COL14A1</i>	0,11	0,8
<i>ABI3BP</i>	0,13	1,0
<i>ANGPTL7</i>	0,11	0,8

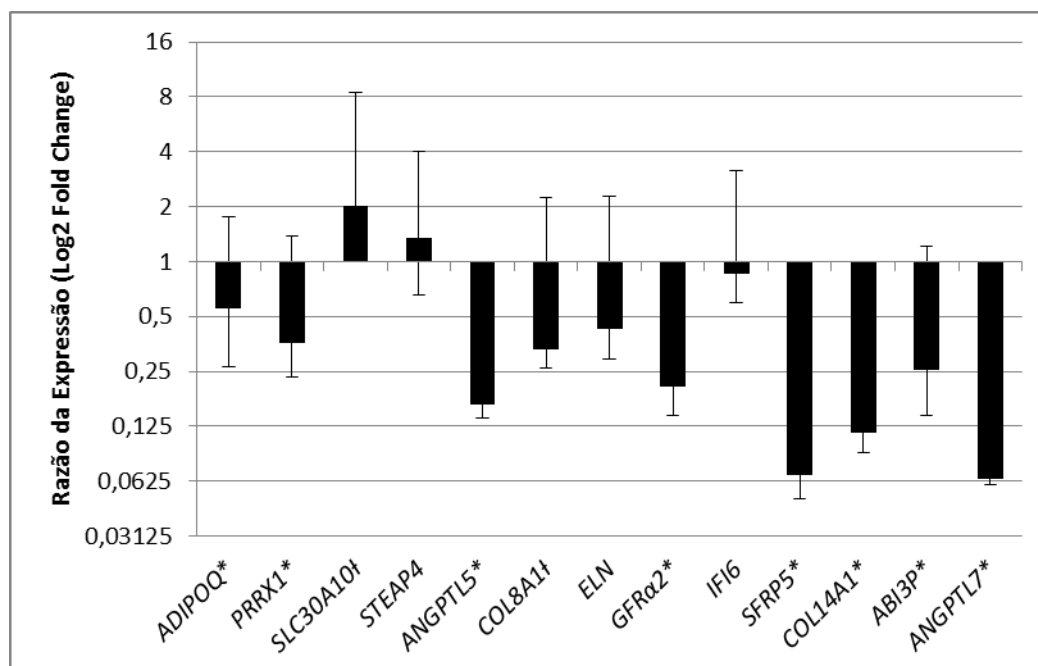


Figura 3 - Expressão relativa dos genes avaliados no fêmur de frangos normais e afetados com BCO aos 35 dias de idade, com seus respectivos valores de amplificação no ciclo limiar (Ct – *cycle threshold*). * Genes diferencialmente expressos com $p < 0,05$ e † Genes diferencialmente expressos com $p < 0,10$.

1 Tabela 3. Valores de LogFC (Log *Fold Change*) e FDR (*False Discovery Rate*) obtidos no
 2 experimento de RNA-seq e de expressão relativa, média de CTs (*Cycle threshold*), erro
 3 padrão e valores de P obtidos nesse estudo.

Gene	Ensembl Gene	RNA-Seq		Expressão Relativa	Médias de CTs	qPCR		Resultado
		FDR	LogFC			Erro padrão (mínimo – máximo)	Valor de P	
SFRP5	ENSGALG00000007515	9,63E-10	-3,94	0,067	25,68	0,017 - 0,335	0,001*	DOWN
ELN	ENSGALG00000001071	5,27E-09	-3,25	0,426	33,40	0,134 - 1,868	0,111	-
ABI3BP	ENSGALG000000015307	6,80E-08	-4,56	0,253	28,98	0,11 - 0,956	0,007*	DOWN
ADIPOQ	ENSGALG000000005554	4,45E-07	-2,05	0,556	24,62	0,29 - 1,215	0,048*	DOWN
ANGPTL7	ENSGALG000000003179	1,15E-05	-5,30	0,064	30,17	0,004 - 0,834	0,047*	DOWN
GFRα2	ENSGALG000000001795	2,40E-05	-3,91	0,206	28,80	0,064 - 0,649	0,001*	DOWN
COL14A1	ENSGALG000000016411	1,24E-05	-3,25	0,115	30,38	0,026 - 0,363	0*	DOWN
STEAP4	ENSGALG000000008997	0,0006	1,82	1,337	22,02	0,682 - 2,673	0,263	-
PRRX1	ENSGALG000000003324	0,0319	-1,59	0,357	30,84	0,126 - 1,023	0,005*	DOWN
SLC30A10	ENSGALG000000026727	0,045	1,92	2,014	27,86	0,655 - 6,468	0,096†	UP
ANGPTL5	ENSGALG000000017191	6,78E-08	-4,38	0,164	26,76	0,025 - 0,774	0,001*	DOWN
COL8A1	ENSGALG000000015253	9,31E-13	-2,30	0,33	28,44	0,068 - 1,903	0,069†	DOWN
IFI6	ENSGALG000000013575	0,02	2,06	0,861	20,77	0,263 - 2,277	0,752	-

4 *Significativos para $p < 0,05$; † Significativos para $p < 0,10$.

5 Legenda: Amostras classificadas como DOWN (*Downregulated*) e UP (*upregulated*) são aquelas que foram
 6 diferencialmente expressas no estudo de validação por qPCR.

7

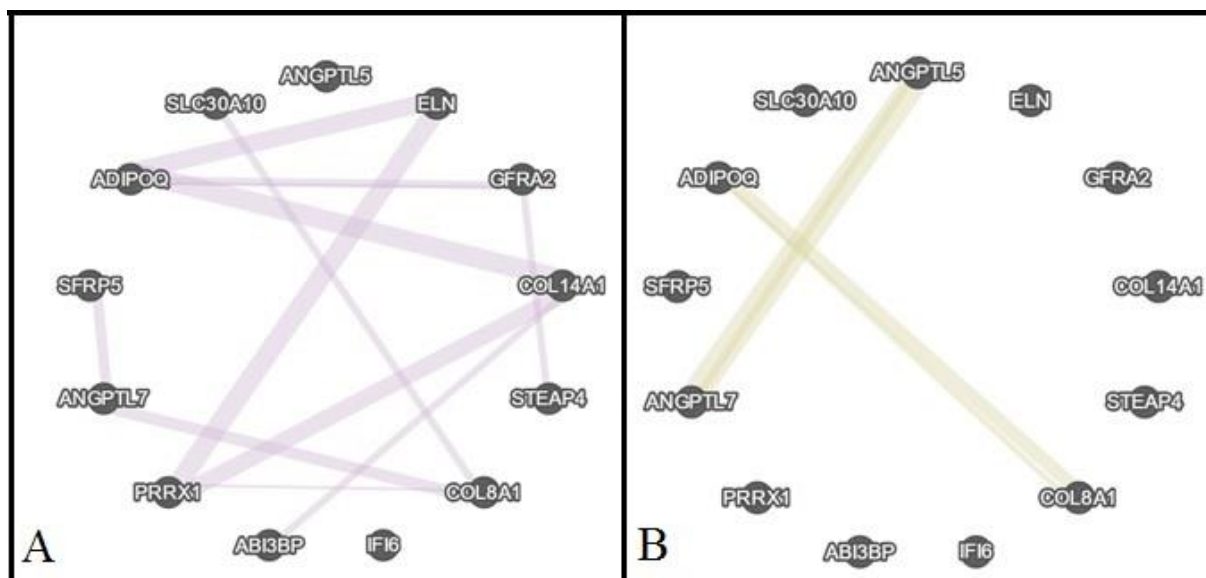


Figura 4 – Redes de interação gênica representando a Co-expressão (A) e Domínios de proteína compartilhados (B), obtidas com o *software* GeneMANIA.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, os genes *ADIPOQ*, *PRRX1*, *GFRa2*, *SFRP5*, *COL14A1*, *ABI3BP*, *ANGPTL5*, *ANGPTL7*, *COL8A1* e *SLC30A10* foram validados como diferencialmente expressos entre frangos normais e afetados com Condronecrose Bacteriana com Osteomielite, aos 35 dias de idade. Observou-se que 9 genes foram menos expressos nas aves afetadas quando comparadas com aves normais e um gene foi mais expresso.

Todos esses genes possuem relação com o metabolismo ósseo em frangos de corte, possivelmente interferindo no aparecimento da BCO e em outras anomalias ósseas.

Mais genes do transcriptoma do fêmur de frangos de corte afetados com BCO devem ser investigados para analisar as vias metabólicas e processos biológicos aos quais esses genes fazem parte, ampliando o estudo das redes gênicas e suas interações. A partir desses conhecimentos será possível elaborar estratégias para a redução da BCO em frangos de corte, diminuindo os prejuízos causados à indústria avícola e melhorando o bem estar das aves.

REFERÊNCIAS

AIRAKSINEN, M.S.; SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **National Revision Neuroscience**. Amsterdam, Holanda. v.3. p. 383-394. Maio. 2002.

ALMEIDA PAZ, I.C.L. Problemas locomotores em frangos de corte – Revisão. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**. Dourados-MS, v.2. n.3. p.263-271, Setembro/Dezembro. 2008.

ALMEIDA PAZ, I.C.L. et al., Follow-up of the development of femoral degeneration lesions in broilers. **Internarional Journal of Morphology**. Botucatu-SP, v.27. p. 571-575, Março. 2009.

ALMEIDA PAZ, I.C.L., et al., Caracterização da degeneração femoral em frangos de corte por meio da densidade mineral óssea. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas-SP, v.9. n.1. Janeiro/Março. 2007.

ALVES, M.C.F. et al., Equilíbrio e problemas locomotores em frangos de corte. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**. Tupã-SP, v.7. n.1. p. 35-44. 2013.

ANDERSEN, C. L. et al, 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, n. 15, p. 5245–5250, 2004.

ANDIA, D.C. et al. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia UNESP**. São Paulo-SP. v.35. p.191-198. 2006.

ANUNCIADO-KOZA, R.P. et al. Adipose tissue *Mest* and *Sfrp5* are concomitante with variations of adiposity among inbred mouse strains fed a non-obesogenic diet. **Biochime**. Scarborough-EUA, v.124. p.134-140. Maio. 2015.

APPLEGATE, T. J.; LILBURN, M. S. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. **Poultry Science**. Oxford. v.81 p.1289-1294, Março. 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA) – Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em < <http://abpa->

br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais > Acesso em: 14 de outubro de 2015.

BANDYOPADHYAY, A. et al. Identification of unique molecular subdomains in the perichondrium and periosteum and their role in regulating gene expression in the underlying chondrocytes. **Developmental Biology**. v.321. p.162-174, Setembro. 2008.

BARBOSA, A.A. 2005. Aspectos químicos, bioquímicos, físicos e mecânicos de fêmures de frangos de corte. Tese (Mestrado em Bioquímica Agrícola). p. 75. Aprovada em 29 de julho de 2005. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. Brasil.

BARRENSCHEE, M. et al. Site-specific gene expression and localization of growth factor ligand receptors RET, GFRA1 and GFRA2 in human adult colon. **Cell Tissue Research**. v.354. p. 371-380, Novembro. 2013.

CALSA Jr., T. et al. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.33. p.88-100. Julho/Dezembro, 2004.

CASTAGNOLA, P. et al. Tissue-specific expression. Of type XIV collagen-a member of the FACIT class of collagens. **European Journal of Cell Biology**. v.59. p.340-347. Dezembro. 1992.

CERRI, P.S. Osteoblasts Engulf Apoptotic Bodies During Alveolar Bone Formation in the Rat Maxilla. **The Anatomical Record Part A**. São Paulo. v.286. p.833-840, Setembro. 2005.

COAN, H.B. et al. Dermatopontin in the extracellular matrix enhances osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. **Musculoskeletal Biology**. Telangana, India. v.1. p.1-8, Agosto. 2014.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: Introduction. **Poultry Science**. v.79: p. 982-984, Fevereiro. 2000.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**. v.24, 2010.

DESRONVIL, T. et al. Distribution of COL8A2 and COL8A1 gene variants in Caucasian primary open angle glaucoma patients with thin central corneal thickness. **Molecular vision**. China. v. 16, p. 2185–2191, Setembro, 2010.

FORNARI, M. B. et al. Unraveling the associations of osteoprotegerin gene with production traits in a paternal broiler line. **Springer Plus**, Londres. v.3. p.1-8. Novembro. 2014.

GENECARDS, Gene *PRRX1*. Disponível em < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRRX1&keywords=PRX1> > Acesso em: 01 de outubro de 2015.

GENECARDS, Gene *STEAP4*. Disponível em < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STEAP4> > Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

GENECARDS, Gene *SLC30A10*. Disponível em < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC30A10> > Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

GENECARDS, Gene *COL14A1*. Disponível em < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL14A1&keywords=col14a1> > Acesso em 24 de fevereiro de 2016.

GENECARDS, Gene *IFI6*. Disponível em < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFI6&keywords=IFI6> > Acesso em 20 de fevereiro de 2016.

HATO, T. et al. The role of Angiopoietin-Like Proteins in angiogenesis and metabolism. **Trend in Cardiovascular Medicine**. v. 18. n. 1. p.6-14. Janeiro. 2008.

HODGKINSON, C.P. et al., Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factors that regulates mesenchymal stem cell biology. **Stem Cells**, Malden, Massachusetts, v.31, p.1669-1692, Agosto. 2013.

HU, M.; POLYAK, K. Serial analysis of gene expression. **Nature Protocols**. v.1. n.4. p. 1743–1760, Novembro. 2006.

IWAMOTO, M. et al. Towards Regeneration of Articular Cartilage. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**. Malden, Massachusetts. v.99. p.192-202, Setembro. 2014.

JIANG, T. et al. Molecular survey of Bacterial Communities Associated with Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) in Broilers. **Plos One**, São Francisco, Califórnia, p.1-20. Abril. 2015.

JELINSKI, S.A. et al. Tenhoo-Selective Genes Identified from Rat and Human Musculoskeletal Tissues. **Journal of Orthopaedic Research**. Saint Louis, Missouri. v.28. p.289-297. Março, 2010.

JOHANSSON, S. et al. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: Application on brain cortices of human chronic alcoholics. **Brain Research**, Boston, EUA. v.1132. p.20-28, Fevereiro. 2006.

JONGE, H.J.M. et al. Evidence based selection of housekeeping genes. **Plos One**. São Francisco, Califórnia. v.2. p.1-5. Setembro. 2007.

KATOH, Y.; KATOH, M. Comparative integromics on angiopoietin Family members. **International Journal of Molecular Medicine**. Atenas, Grécia. v. 17. p. 1145-1149, Junho. 2006.

KAWAMOTO, E.M. et al. Effect of activation of canonical Wnt signaling by the Wnt-3a protein on the susceptibility of PC12 cells to oxidative and apoptotic insults. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, SP. v.45. p. 58-67, Janeiro. 2012.

KERSCHITZKI, M. et al. Bone Material Influenced by Osteocytes. p. 123. Tese de Doutorado (Doutorado em Física) - Universidade de Matemática e Ciências Naturais. Berlim, Alemanha. 24 de fevereiro de 2012.

KIM, H. et al. The association between polymorphisms in Wnt antagonists genes and bone respond to hormone therapy in postmenopausal Korean women. **Menopause: The journal of The North American Menopause Society**. Orlando, Flórida. v. 19. n. 9. p.1008-1014, Setembro. 2012.

KIM, K.C. et al. The association between genetic variants of *RUNX2*, *ADIPOQ* and vertebral fracture in Korean postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v.33. p. 173-179. Março. 2014.

KINI, U.; NANDEESH, B.B. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**, p.29-57, 2012.

KHOURY, M. et al. Mesenchymal stem cells secreting angiopoietin-like-5 support efficient expansion of human hematopoietic stem cells without compromising their repopulating potential. **Stem cells and development**, Novs Rochelle, NY. v. 20, n. 8, p. 1371-1381, Agosto. 2011.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal Applied Genetic**. v.54. p. 391-406, Setembro. 2013.

KURATANI, S. et al. The expression. Pattern of the chick Homeobox Gene gMHOX suggests a role in patterning of the limb and face and in compartmentalization of somites. **Developmental Biology**. v. 161. P.357-369. Setembro, 1994.

KWON, J.N.; GOATE, A.M. The candidate gene approach. **Alcohol Research & Health**. p.164-168. 2000.

LEDUR, M. C. et al. O Uso de Marcadores Moleculares na Produção de Aves. In: Bridi, A. M., Fonseca, N. A. N., Silva, C. A., Pinheiro, J. W. Zootec 2007 - A zootecnia frente a novos desafios. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. p. 457-482, 2007.

LEYVA-ILLADES, D. et al. SLC30A10 Is a Cell Surface-Localized Manganese Efflux Transporter, and Parkinsonism-Causing Mutations Block Its Intracellular Trafficking and Efflux Activity. **Journal of Neuroscience**, Washington, DC, EUA. v. 34, n. 42, p. 14079–14095, Outubro. 2014.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. **Methods**. v. 25, p. 402-408, Dezembro. 2001.

LUO, X.; et al. Adiponectin Stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.21. Julho, 2006.

MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.35. p.1301-1305. Setembro, 2003.

MARTIN, J. F. et al.,. The paired-like homeo box gene MHox is required for early events of skeletogenesis in multiple lineages. **Genes and Development**. v. 9, n. 10, p. 1237–1249, Maio. 1995.

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, Agosto. 2000.

MENDES, A.S. et al., Mensuração de problemas locomotores e de lesões no coxim plantar em frangos de corte. **Archivos de Zootecnia**. Córdoba, Espanha. v.61, p. 217-228, Novembro. 2012.

NAG, A. et al. CNV Analysis in Tourette Syndrome Implicates Large Genomic Rearrangements in COL8A1 and NRXN1. **PLoS ONE**, São Francisco, Califórnia. v. 8, n. 3, p. 8–13, Março. 2013.

NARVAREZ, C.J. et al. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. **Journal of Cellular Physiology**. Malden, Massachusetts. v.228. p.2024-2036. Outubro. 2013.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), gene ABI3BP. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=abi3bp+gallus+gallus> > Acesso em 03 de abril de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), gene PRRX1. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=prrx1+gallus+gallus> > Acesso em 01 de maio de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene SFRP5. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/423838> > Acesso em: 15 de maio de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene GFRa2. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=gfra2+gallus+gallus> > Acesso em: 15 de julho de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene ELN. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=eln+gallus+gallus> > Acesso em: 16 de abril de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene COL14A1. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=col14a1+gallus+gallus> > Acesso em: 16 de junho de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene ADIPOQ. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/404536> > Acesso em: 25 de abril de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), gene ANGPTL5. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=angptl5+gallus+gallus> > Acesso em: 22 de fevereiro de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), gene STEAP4. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=steap4+gallus+gallus> > Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), gene SLC30A10. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=slc30a10+gallus+gallus> > Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), gene COL8A1. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=col8a1+gallus+gallus> > Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene IFI6. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ifi6+gallus+gallus> > Acesso em: 23 de fevereiro de 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), Gene ANGPTL7. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/101750033> > Acesso em: 24 de fevereiro de 2016.

NOHNO, T. et al. A chicken homeobox gene related to *Drosophila paired* is predominantly expressed in the developing limb. **Developmental Biology**. v.158. p.254-264, Julho. 1993.

NONAKA, R.; SATO, F.; WACHI, H. Domain 36 of Tropoelastin in Elastic Fiber Formation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 37. n.4, p.698-702, Abril. 2014.

OO, T.F.; KHOLODILOV, N.; BURKE, R.E. Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal glial cell line-derived

neurotrophic factor in vivo. **Journal Neuroscience**. Washington, DC, EUA. v.15, p.5141–5148, Junho. 2003.

PAIC, F. et al. Identification of Differentially Expressed Genes Between Osteoblasts and Osteocytes. **Bone**. v.45. p. 682-692, Outubro. 2009.

PARKER, N.; PORTER, A.C.G. Identification of a novel gene family that includes the interferon-inducible human genes 6-16 and *ISG12*. **BMC Genomics**. v.19, p.1-11. Janeiro, 2004.

PEEK, R. et al. Molecular cloning of a new angiopoietin like factor from the human cornea. **Investigative ophthalmology & visual science**. v.39, p.1782-1788, Setembro, 1998.

PEIXOTO, J.O. et al., Validação do marcador molecular LEPR1 A>G para características de crescimento em linhagem paterna de frango de corte. Anais de congresso: VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. Maringá, PR, julho de 2010. Disponível em < <http://sbmaonline.org.br/anais/viii/trabalhos/pdfs/A510.pdf> > Acesso em: 22 de julho de 2015.

PEIXOTO, J.O. et al. Melhoramento genético. Disponível em < https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000g0gyjqot02wx5ok026zxpgegv9oxm.html > Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

PÉREZ-RICO, C. et al., Elastin development-associated extracellular matrix constituents of subepithelial connective tissue in human pterygium. **Anatomy and Pathology/Oncology**. V. 55. n. 10. p.6309-6318, Outubro, 2014.

PFAFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biothechnology Letters**, v.26, p.509-515, 2004.

REGARD, J.B.; ZHONG, Z.; WILLIAMS, B.O.; YANG, Y. Wnt Signaling in bone development and disease: Making stronger bone with Wnts. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, p.1-17, 2012.

ROSE-MARTEL, M. et al. Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization. **Journal of Proteomics**, v.116. p. 81-96, Janeiro. 2015.

SANTULLI, G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. **Frontiers in Endocrinology**. Lausana, Suíça. v. 23. p.1-6, Janeiro, 2014.

SEPTEMBER, A.V. et al. The COL12A1 and COL14A1 genes and Achilles Tendon injuries. **Genetics & Molecular Biology**. v.29. p. 257-263, Janeiro. 2007.

SILVA, F.A. et al. Efeitos do ácido L-Glutâmico e da vitamina D nos fêmures e tibiotarsos de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, BR. v.30 , p-2067-2077, 2001.

SILVA, T.C. et al. Vitamina D3 transactivates the zinc and manganese transporter SLC30A10 via the Vitamin D receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.163. p.77-87, Outubro. 2016.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, 2006.

SMITH, D.W. Is avascular necrosis of the femoral head the result of inhibition of angiogenesis? **Medicinal Hypotheses**, v.49, p.497-500, Dezembro. 1997.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA - SNA. Produção brasileira de carne de frango superou a chinesa no ano passado. **Revista da Sociedade Nacional de Agricultura**. Em 27 de janeiro de 2016. Disponível em < <http://sna.agr.br/producao-brasileira-de-carne-de-frango-superou-a-chinesa-no-ano-passado/> > Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

SOUZA, A.F.G.O. Tecido ósseo em frangos de corte. **Revista Nutritime**, artigo 152; v.9, n.1, p.1663-1679. Jan/Fev de 2012. Disponível em < http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/152v9N1P1663_1679_JAN2012_.pdf > Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

SOYSA, N. S. et al. Osteoclast formation and differentiation: An overview. **Journal of Medical and Dental Science**. Tokio, v.59, p.65-74, Junho. 2012.

TAHMOORESPUR, M. et al. Evaluation of adiponectin gene expression in the abdominal adipose tissue of broiler chickens: feed restriction, dietary energy, and protein influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. **Poultry Science**. Reino Unido. v.89, p.2092-2100, Outubro. 2010.

TAN, X. et al. SFRP5 correlates with obesity and metabolic syndrome and increases after weight loss in children. **Clinical Endocrinology**, Malden, Massachusetts. v.81, p.363-369, Setembro. 2014.

TANG, F. et al. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. **Nature Protocols**. Londres, v.5. n.3. p.516-535, Fevereiro. 2010.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. **Journal of Biotechnology**. V.75, p.291–295, Junho. 1999.

TIAN, L.; YU, X. Lipid metabolism disorders and bone dysfunction-interrelated and mutually regulated (Review). **Molecular Medicine Reports**, Atenas, Grécia, v. 12, n. 1, p. 783–794, Julho. 2015.

UBABEF, Relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal, 2014. Disponível em < <http://abpa-br.com.br/?m=75&date=2012-04> > Acesso em 10 de agosto de 2015.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 34, 2002.

VARGAS-LEAL, V. et al. Expression and function of glial cell line-derived neutrophilic factor family ligands and their receptors on human immune cells. **The Journal of Immunology**. v. 15. p. 2301-2308, Agosto. 2015.

WANG, Z. et al. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews|Genetics**. V.10. p.57-63. Janeiro. 2009.

WEI, L. et al. Use of a universal hydroxymethylbilane synthase (HMBS)-based PCR as an endogenous internal control and enable typing of mammalian DNAs. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v.98, p.5579-5587, Junho. 2014.

WIDEMAN Jr, R.F. et al. A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: Evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. **Poultry Science**, Oxford, Reino Unido. v.91, p.870-883, Abril. 2012.

WIDEMAN, R.F.; PRISBY, R.D. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translation model for the

pathogenesis of femoral head necrosis. **Frontiers in Endocrinology**, v.3. p.1-15, Janeiro. 2013.

XIAO, Y. et al. ANGPTL7 regulates the expression and repopulation of human hematopoietic stem and progenitor cells. **Hematopoiesis**, v.100, p.585-594, Maio. 2015a.

XIAO, Y. et al. Loss of Angiopoietin-like 7 diminishes the regeneration capacity of hematopoietic stem and progenitor cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v.8. p.1-5, Fevereiro. 2015b.

YANG, G. et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leucosis virus subgroup J. **BMC Research Notes**, v.6, p.1-5, Outubro, 2013.

YOUNG, B.B.et al. The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. **Journal of Cellular Biochemistry**. V.8, p. 208–220, Agosto. 2002.

YOUNG, B.B. et al. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth os collagen fibrils. *Development Dinamics*. V.217. p;430-439, Abril, 2000.

ZHANG, F. et al. Genome-wide copy number variation study and gene expression analysis identify ABI3BP as a susceptibility gene for Kashin-Beck disease. **Human Genetics**, Malden, Massachusetts, v.133, p.793-799, Junho. 2014.

ZHOU, J.; YE, S.et al. STEAP4 Plays a critical role in osteoclastogenesis in vitro by regulating cellular Iron/Reactive oxygen species (ROS) levels and cAMP response element-binding protein (CREB) activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, p.30064-30074, Outubro. 2013.

ANEXOS

Anexo I – Folha de aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais da Embrapa
Suínos e Aves

 Suínos e Aves	Certificado de Conduta Ética	ETICA 1/1
--	------------------------------	--------------

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº (000/AAAA): 012/2012, sob título “Identificação de genes associados à problemas locomotores em frango de corte por meio de RNAseq do fêmur”, sob responsabilidade de Jane de Oliveira Peixoto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), **TENDO SIDO CONSIDERADO APROVADO PELA Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/CNPSA)** em reunião realizada em 23/08/2012.

CERTIFICATE

We certify that the Protocol nº (000/YYYY): 012/2012, under the following title “Identification of genes associated with leg weakness in broilers by RNAseq femur” is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Embrapa Swines and Poultry Ethical Committee for Animals utilization in experimentation (CEUA/CNPSA) in 08/23/2012.

Concórdia, 23/08/2012.



Presidente CEUA/CNPSA