

ASSOCIAÇÃO DE UM SNP NO GENE DA CALMODULINA COM CARACTERÍSTICAS DE INTEGRIDADE DA TÍBIA EM FRANGOS DE CORTE

Kamilla Bleil do Carmo¹, Adriana Mércia Guaratini Ibelli², Igor Ricardo Savoldi¹,
Rafael Keith Ono³, Jane de Oliveira Peixoto⁴, Mônica Corrêa Ledur⁴

¹Graduando de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia,
Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC, kamillableil@hotmail.com

²Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

³Pós-doutorando ICASA

⁴Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: integridade óssea, *CALM*, polimorfismo, cálcio.

INTRODUÇÃO

A produção avícola brasileira apresenta posição de destaque na economia mundial, decorrente de expressivas melhorias na eficiência produtiva ao longo dos anos, tornando a avicultura essencial para o desenvolvimento econômico do país. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango no mundo, atrás apenas dos EUA, mas ocupando a liderança na exportação deste produto (2). Esses progressos foram obtidos a partir de melhorias na sanidade, manejo, nutrição e principalmente pelo melhoramento genético, realizado com base na seleção fenotípica, que atualmente tem sido complementada com informações moleculares, possibilitando ganhos genéticos adicionais (4). No entanto, com as altas taxas de crescimento e elevado peso corporal dos frangos de corte, houve também um aumento da frequência de problemas locomotores, gerando preocupação a respeito do bem estar animal e perdas de produtividade e desempenho das aves (9). O gene da calmodulina (*CALM*) codifica uma proteína ubíqua que possui uma importante função de ligações aos íons de cálcio (Ca^{2+}) e regulação celular. Em frangos, a *CALM* é expressa regulando hormônios relacionados com o desenvolvimento muscular, na deposição de cálcio nos ossos e na formação da casca do ovo (8). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de genotipagem, utilizando sondas Taqman por PCR em Tempo Real (qPCR), para detectar a presença do SNP g.485C>T (rs313128828) no gene da Calmodulina na galinha e também realizar a associação deste polimorfismo com características relacionadas à integridade da tíbia em uma linha paterna de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a padronização da técnica de qPCR, inicialmente foram selecionadas 25 amostras de aves com genótipos conhecidos, previamente sequenciadas para a confirmação da especificidade da sonda. Foi realizada uma reação de PCR em tempo real em equipamento QuantStudio 6 (Applied Biosystems) com o volume final de 20 μ l. Para a reação, foram utilizados reagentes com volumes específicos: 125 ng/ μ l de DNA por amostra, 0,2 μ l de tampão Master Amp (Epicenter), 3 μ l de Mastermix GoTaq[®] Probe qPCR 2X (Promega) e Sonda Taqman[®] SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) na concentração de 20X, contendo iniciadores específicos: um primer direto (5'-GCGTAAGTTTATTCTGCTTTTGACAA-3') e um primer reverso (5'-CTACAGTGCCATTAGCCACATATGCT-3'), conjuntamente com uma sonda marcada com o fluoróforo FAM para o alelo C (5'-TGCAGGATAAAAAGCGTGT-3') e uma sonda marcada com o fluoróforo VIC para o alelo T (5'-CTGCAGGATAAAAAGTGTGT-3'). Os iniciadores e sondas foram desenhados para isolar a região do gene da *CALM* que continha o polimorfismo de interesse (SNP g.485C>T). Após este teste inicial, foram selecionadas três amostras controle, sendo uma amostra para cada genótipo CC, CT e TT. Para a realização da análise de associação do SNP g.485C>T no gene da calmodulina, foi realizada a genotipagem de 384 aves de uma linha pura paterna de corte (TT) desenvolvida na Embrapa Suínos e Aves, além dos três controles de referência previamente genotipados. As reações de qPCR foram realizadas conforme descrito anteriormente. As condições de ciclagem foram: um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por dois minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão de 60°C por 45 segundos. Após a genotipagem, foi possível verificar a discriminação alélica das amostras. Posteriormente, foi realizada a análise de associação dos genótipos com 15 características fenotípicas mensuradas nas tíbias da população TT, sendo estas: peso aos 42 dias (kg), peso do osso do peito (g), porcentagem do osso do peito (%), peso da tíbia ao abate (g), peso da tíbia resfriada, porcentagem da tíbia (%), comprimento da tíbia (mm), espessura da tíbia (mm), teores de Matéria Seca (%), Cinzas (%), Cálcio (mg/kg), Fósforo (mg/kg), Cálcio/Fósforo e Magnésio da tíbia (mg/kg) e força de quebra (kgf). As análises de associação entre o SNP g.485C>T e as características foram realizadas no programa QxPak v.4.1 (6), que utiliza procedimentos de máxima verossimilhança, usando um modelo misto no qual foram incluídos os efeitos fixos de sexo, incubação e do SNP e os efeitos aleatórios infinitesimal e o erro residual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 384 animais genotipados, 272 (70,8%) apresentaram o genótipo CC, 73 (20 %) o genótipo CT e 39 (10%) o genótipo TT. Houve associação significativa entre o SNP analisado e porcentagem da tíbia ($P= 0,02$) e sugestiva para o comprimento da tíbia ($P= 0,06$), com efeitos aditivos de $-0,064\pm 0,028$ e $0,61\pm 0,32$, respectivamente. Para os outros fenótipos avaliados não foram observadas diferenças

significativas. Dessa forma, esse SNP está associado ao aumento do comprimento da tíbia e redução da proporção do peso da tíbia em relação ao peso corporal aos 42 dias de idade. Considerando a função do gene *CALM*, é possível que esse polimorfismo possa interferir na expressão de outros genes que atuam na cartilagem óssea ocasionando modificações estruturais nas tíbias das galinhas. Estudos sugerem que o gene da calmodulina tem importantes funções na diferenciação dos condrócitos e na manutenção da cartilagem dos ossos, principalmente em reposta a estímulos mecânicos (8), agindo como um importante regulador da condrogênese (10). Por esta razão, uma diminuição do nível do gene da calmodulina ocasiona a diminuição dos condrócitos na cartilagem, danificando e prejudicando suas propriedades mecânicas, resultando em doenças articulares (7). Além disso, polimorfismos no gene da *CALM* já foram associados à osteoartrite (AO) no quadril e joelho em seres humanos, assim como, a inibição desta proteína foi responsável por diminuir a expressão de genes essenciais da matriz de cartilagem e dos ossos (7). A matriz inorgânica óssea é formada principalmente por íons fosfato e cálcio, cuja união destes é muito importante para a formação de cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados com fibras colágenas, fornecem a dureza e resistência do tecido ósseo (1). Desta forma, o polimorfismo estudado, que está localizado na região 3' não traduzida do gene *CALM*, pode afetar a expressão da proteína a ser formada, influenciando processos como a poliadenilação, localização e estabilidade do RNA mensageiro que será produzido, afetando tanto a condrogênese quanto a osteogênese na tíbia de frangos de corte.

CONCLUSÕES

Foi possível padronizar a genotipagem do SNP g.485C>T do gene da Calmodulina por qPCR. O SNP estudado foi associado à porcentagem e comprimento da tíbia em frangos de corte, possivelmente atuando em modificações estruturais do osso e cartilagem.

REFERÊNCIAS

1. ANDIA, Denise C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológico. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual da ABPA 2017**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em: 22 ago.2017.
3. COSTA, L.S; GARCIA, L.A.F; BRENE,P.R.A. **Panorama do Setor de Frango de Corte no Brasil e a Participação da Indústria Avícola Paranaense no Complexo Dado seu Alto Grau de Competitividade**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GESTÃO DE PROJETOS, INOVAÇÃO E SUSTENTABILIDADE, São Paulo, 2015.
4. LEDUR, M. C.; BERTANI, G. R.; NONES, K. **Genômica nos Programas de Melhoramento Genético Avícola**. In: CONFERÊNCIA APINCO 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 2003, Campinas. Campinas: FACTA, 2003. p. 87-105.
5. MOTOTANI, H. A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 8, p.1009-1017, 9 mar. 2005.
6. PEREZ-ENCISO, M.; MISZTAL, I. Qxpak: a versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. **Bioinformatics**, v. 20, n. 16, p.2792-2798, 27 maio 2004.
7. MOTOTANI, Hideyuki et al. Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 5, p.547-553, 3 mar. 2010.
8. SILVA, E.A. **Níveis de cálcio e relações cálcio: fósforo em rações para galinhas poedeiras leves**. Viçosa – MG, 2014. 130f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2014.
9. SOUZA, C.G et al. **Variabilidade Genética do Peso Corporal e Integridade Óssea da Tíbia em uma Linhagem Paterna de Frangos de Corte**. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, Uberaba, 2013.
10. TOMITA, Masuhiro et al. Calcineurin and NFAT4 Induce Chondrogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p.42214-42218, 17 set. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).