

## EXPRESSÃO DO GENE RECEPTOR DA LEPTINA (LEPR) EM FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS PELA NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR

Jorge Augusto Petrolí Marchesi<sup>1</sup>; Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>2</sup>;  
Ediane Paludo<sup>3</sup>; Fernando de Castro Tavernari<sup>4</sup>; Jane de Oliveira Peixoto<sup>4</sup>;  
Mônica Corrêa Ledur<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Estagiário na Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC. [jorgea\\_petroli@hotmail.com](mailto:jorgea_petroli@hotmail.com)

<sup>2</sup>Analista da Embrapa Suínos e Aves

<sup>3</sup>Doutoranda da Universidade do Estado de Santa Catarina, campus Lages

<sup>4</sup>Pesquisador(a) da Embrapa Suínos e Aves

**Palavras-chave:** Expressão gênica, qPCR, problemas locomotores.

### INTRODUÇÃO

Os problemas locomotores impactam negativamente a produção e o bem-estar dos frangos de corte. Estas condições têm sido geralmente associadas à seleção genética para um rápido crescimento e ganho de peso corporal. Enquanto o peso e rendimento dos frangos têm aumentado significativamente ao longo das últimas décadas, o sistema esquelético, aparentemente, não conseguiu evoluir em paralelo, não sendo suficiente para suportar o peso dos animais e assim gerando diversas desordens locomotoras (5). Essas desordens estão principalmente relacionadas à degeneração óssea femoral e têm sido consideradas como uma das principais preocupações da avicultura mundial. Entretanto, poucas pesquisas têm se dedicado à compreensão da história natural dessa condição. A necrose da cabeça femoral (NCF) foi inicialmente descrita como um estado associado com a bactéria *Staphylococcus aureus*, no entanto existe um tipo de necrose da cabeça do fêmur que é asséptica, onde muitos dos fatores associados são de origem nutricional, ambiental e principalmente genética (3).

Em muitas espécies, o gene da leptina (*LEP*) é amplamente estudado devido a sua função associada ao armazenamento no tecido adiposo e a eficiência alimentar. Além disso, estudos recentes têm demonstrado a atuação do hormônio leptina na ossificação endocondral. Contudo, na galinha, não se sabe da existência deste gene, uma vez que muitas tentativas de mapeá-lo foram realizadas sem sucesso. No entanto, o gene receptor de leptina (*LEPR*) é expresso de forma funcional e pode fornecer as informações sobre a compreensão da leptina, assim como, a sua importância no metabolismo ósseo. Esse receptor atua diretamente na diferenciação de osteoblastos, assim como na proliferação de condrócitos (1). Nesse contexto, o presente estudo busca avaliar a expressão do gene do receptor da leptina em frangos de corte afetados e não afetados por necrose da cabeça do fêmur.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas amostras de fêmur de 20 frangos de corte com 45 dias de idade, sendo 10 afetados e 10 não afetados por necrose da cabeça do fêmur. O isolamento de RNA total do osso do fêmur foi realizado utilizando o protocolo de extração de RNA descrito por Ibelli et al. (2009) (adaptado de Chomczynski & Sacchi, 1987) com Trizol (Invitrogen). O RNA foi quantificado usando espectrofotômetro NanoDrop 2000 (produtos NanoDrop; Wilmington, EUA) e a pureza e integridade do RNA foram avaliadas em eletroforese com gel de agarose 2%. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript III (Invitrogen), seguindo a instrução do fabricante. Para a quantificação da expressão relativa do gene *LEPR* foram desenhados iniciadores na junção exon-exon, sendo eles: F 5' TGGTTTCGCACCGAAGAATG 3' e R 5' TTGCTTCAGGGTGCTTGACA 3'. Como normalizador foi utilizado o gene constitutivo *HBMS*. A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no equipamento de PCR em tempo real ABI 7500 SDS (*Applied Biosystems*), utilizando o corante SYBR Green, e com as amostras em duplicata. Os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos foram submetidos à análise no Relative Expression Software Tool (REST<sup>®</sup>) (5).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *LEPR* apresentou amplificação tardia, indicando uma baixa expressão desse gene no fêmur. O Ct médio do grupo afetado foi 30,73 e do grupo controle foi 31,42. De acordo com os resultados (Fig. 1), não houve diferença na expressão do gene *LEPR* em frangos de corte com 45 dias de idade entre os grupos afetados ou não pela necrose da cabeça do fêmur, sugerindo que este gene não esteja atuando de forma significativa na ocorrência desta desordem. No entanto, isso não descarta a possibilidade da existência de regulação pós-transicional desse receptor, uma vez que já foi verificado *in silico* que os microRNAs GGA-miR-2128, GGA-miR-449, miR-GGA-34, GGA-miR-1459, GGA-miR-1458 e GGA-miR-1571 foram preditos para atuar na região 3'UTR do *LEPR*. Um desses microRNAs, o miR-34, já foi descrito como envolvido com genes de desenvolvimento ósseo em humanos e ratos (1). A influência do *LEPR* em características de integridade óssea já foi relatada em frangos de corte em condições fisiológicas normais, apresentando

efeito aditivo em características como o teor de zinco no fêmur, teor de matéria seca da tíbia, força de quebra óssea, peso da tíbia e comprimento do fêmur (1).

### CONCLUSÃO

De acordo com esse estudo, a expressão do gene *LEPR* em frangos de corte de 45 dias de idade não está relacionada à presença de necrose da cabeça do fêmur. No entanto, mais estudos biológicos que envolvam a análise funcional do gene em frangos de diferentes idades são necessários para descartar a sua atuação no desenvolvimento ou não desse problema em frangos de corte.

### REFERÊNCIAS

1. IBELLI, A. M. G.; PEIXOT, J. O.; MARCHESI, J. A. P.; COUTINHO, L. L.; LEDUR, M. C. **New Insights on the Influence of Leptin Receptor Gene in Bone Traits in Broilers**. Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. 2014.
2. IBELLI, A. M. G.; REGITANO, L. C. A.; MÉO, S. C. **Extração de RNA**. In: REGITANO, L. C. A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S. Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal. 1ª Edição. São Carlos, 2007. Disponível em: <[www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/e-book/LivroProtMol.pdf](http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/e-book/LivroProtMol.pdf)>. Acesso em: 08 set. 2014.
3. OLKOWSKI, A. A.; LAARVELD, B.; WOJNAROWICZ, C.; CHIRINO-TREJO, M.; CHAPMAN, D.; WYSOKINSKI, T. W.; QUARONI, L. Biochemical and physiological weaknesses associated with the pathogenesis of femoral bone degeneration in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 40, n. 6, p. 639-650, 2011.
4. PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 1, n. 9, 2002.
5. SHARMAN, P. W. A.; MORRICE, D. R.; LAW, A. S.; BURT, D. W.; HOCKING, P. M. Quantitative trait loci for bone traits segregating independently of those for growth in an F2 broiler x layer cross. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, p. 296-306, 2007.

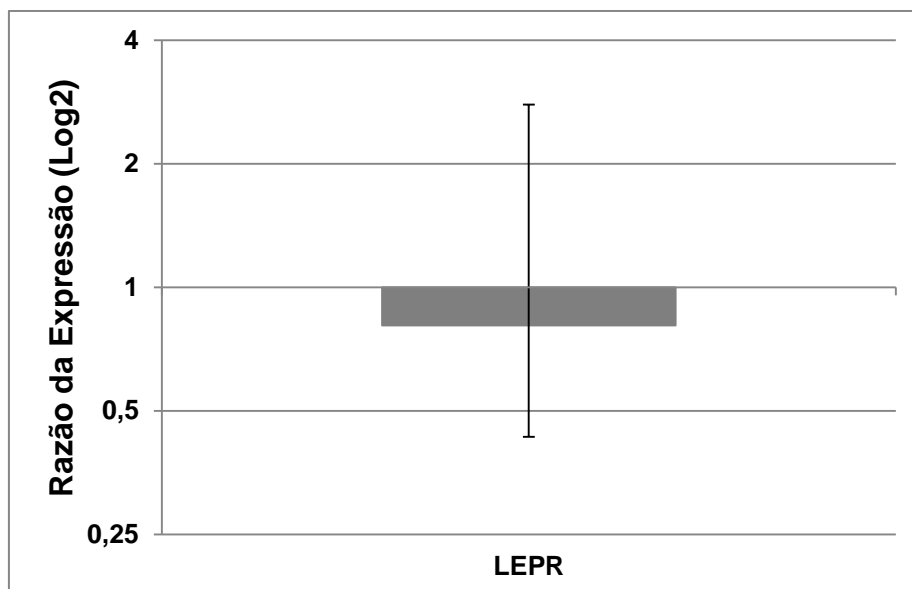


Fig. 1. Razão de expressão do gene *LEPR* no osso da cabeça do fêmur de frangos de cortes normais e afetados com Necrose da Cabeça do Fêmur, normalizada para um gene referência (*HBMS*).