

## EXPRESSÃO DO GENE *CHST-1* EM FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS PELA NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR

Kamilla Bleil do Carmo<sup>1</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>2</sup>, Igor Ricardo Savoldi<sup>1</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>3</sup>, Caroline Michele Marinho Marciano<sup>4</sup> e Mônica Corrêa Ledur<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves.

<sup>4</sup>Graduanda em Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso.

**Palavras-chave:** condronecrose bacteriana com osteomielite, L-selectina, expressão gênica.

### INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente se destaca no mercado mundial pelo crescimento da indústria avícola, tendo grande importância na economia brasileira. No entanto, alguns problemas metabólicos têm aumentado ao longo dos anos causando perdas econômicas para os produtores de aves e a indústria avícola. A pressão na seleção genética, alta densidades e modificações nas dietas promovem excelentes resultados de desempenho, mas também ocasiona alguns distúrbios genéticos. Um dos problemas mais observados atualmente na avicultura de corte está associado à necrose da cabeça do fêmur (NCF). A NCF ou condronecrose bacteriana com osteomielite é uma afecção de esqueleto frequente em frangos de corte que ocasiona separação, fragmentação e, conseqüentemente, necrose da cabeça do fêmur, podendo também ser agravada devido à presença de bactérias, com aparecimento do tecido caseoso. O gene da Carbohidrato sulfotransferase 1 (*CHST-1*) em algumas espécies, principalmente a humana, é amplamente estudado por ser predominantemente expresso no músculo esquelético. Este é responsável pela produção de ligantes de L-Selectina, moléculas de adesão dependentes do cálcio que atuam em conjunto com as integrinas, sendo importantes na migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos, fixando-os ao endotélio. Contudo, na galinha, não se sabe ao certo a atuação deste gene. Neste contexto, o presente estudo busca avaliar a expressão do gene *CHST-1* em frangos de corte normais e afetados pela necrose da cabeça do fêmur.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas amostras de fêmur de 20 frangos de corte machos com 35 dias de idade, sendo 10 normais e 10 afetados pela necrose da cabeça do fêmur. O isolamento do RNA total do osso do fêmur foi realizado utilizando Trizol (Invitrogen), seguido pelo *clean-up* utilizando RNeasy mini kit (Qiagen). O RNA foi quantificado com o equipamento Biodrop e a pureza e integridade do RNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1,5%. A síntese de cDNA foi realizada com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para a quantificação da expressão relativa do gene *CHST-1* foram utilizados iniciadores específicos, sendo eles: direto 5' CGCCCTCTTTCTCGTCTTC 3' e reverso 5' GCTTGGAGAGACCCGATTCC 3', desenhados no programa *primer-blast* do NCBI. Como normalizadores foram utilizados os genes constitutivos *RPL4* e *RPL30*. As amostras de cDNA foram padronizadas com diluição 1:10. A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no equipamento de PCR em tempo real *QuantStudio 6 Flex System Software* (*Applied Biosystems*), utilizando-se o mastermix *SYBR Green* e amostras em duplicata com o volume total de 15ul. Os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos foram submetidos à análise no programa *Relative Expression Software Tool* (REST) 2009.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *CHST-1* apresentou amplificação, iniciando-se no 18º ciclo da qPCR, apresentando-se aproximadamente 4 vezes menos expresso no grupo afetado com NCF quando comparado com o normal ( $p < 0,043$ ) (Figura 1). De acordo com este estudo, a expressão do gene *CHST-1* pode estar relacionada à necrose da cabeça do fêmur em frangos de corte de 35 dias de idade. O gene *CHST-1* é responsável pela produção dos ligantes de L-Selectina em células endoteliais vasculares, como já descrito em diversos estudos (2). Sendo assim, sua expressão reduzida pode levar a uma perda de vascularização do tecido ósseo e conseqüente morte celular, o que provavelmente favoreça o desenvolvimento da NCF. Outra função relevante deste gene está relacionada ao sistema imunológico, recrutando células imunes para o sítio de inflamação. A diminuição da expressão deste gene poderia favorecer a presença de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus spp* na NCF em frangos de corte, as quais são frequentemente associadas a NCF. No entanto, mais estudos biológicos que envolvam a análise funcional do gene *CHST-1* em frangos são necessários para o melhor entendimento desta afecção.

### CONCLUSÕES

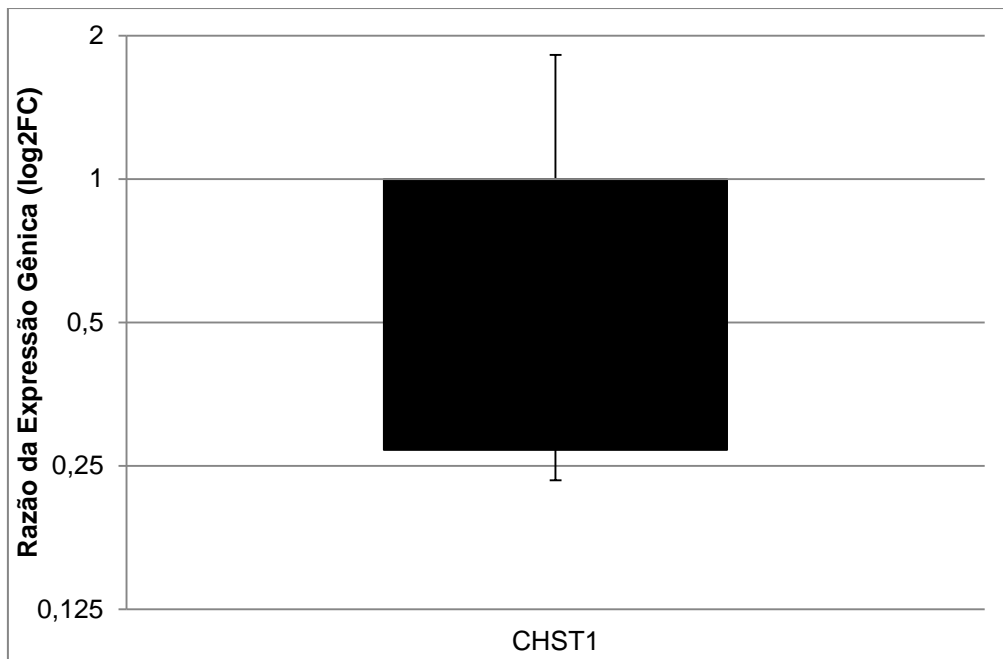
O gene *CHST-1* apresentou expressão quatro vezes menor em frangos afetados com necrose da cabeça do fêmur em relação aos frangos normais, favorecendo esta condição em frangos de corte.

### AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado com recursos do projeto do MP1 da Embrapa número 01.11.07.002.04.03. Os autores agradecem ao técnico Alexandre L. Tessmann pelo suporte laboratorial.

### REFERÊNCIAS

1. LIDA, A. et al. Catalog of 77 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the carbohydrate sulfotransferase 1 (*CHST-1*) and carbohydrate sulfotransferase 3 (*CHST3*) genes. **J. Hum. Genet.**, n. 47, p. 14 - 19, 18 sept. 2001.
2. LI, X.; TEDDER, T. F. *CHST-1* and *CHST2* Sulfotransferases Expressed by Human Vascular Endothelial Cells: cDNA Cloning, Expression and Chromosomal Localization. **Genomics**, Durham, North Carolina, n. 55, p. 345–347, 16 oct. 1998.
3. LYNCH, S. J.; ZAVADIL, J.; PELLICER, A. In TCR-Stimulated T-cells, N-ras Regulates Specific Genes and Signal Transduction Pathways. **Plos One**, Itália, v. 8, n. 6, 5 sept. 2012
4. MCNAMEE, P. T; SMYTH, J. A. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: A review. **Avian Pathology**, Northern Ireland, n. 29, p. 477– 496, 31 March. 2000.
5. NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Carbohydrate Sulfotransferase and Tyrosylprotein Sulfotransferase. **Biol. Pharm. Bull.**, Japão, n. 30, p. 821 – 825, 22 jan. 2007.
6. PATNODE, M. L. et al. KSGal6ST generates galactose-6-O-sulfate in high endothelial venules but does not contribute to L-selectin-dependent lymphocyte homing. **Glycobiology**, v. 23, n. 3, p. 381 - 394, 25 oct. 2012.
7. PAZ, I. C. L. Problemas Locomotores em Frangos de Corte. **BioEng**, Campinas, v.2, n.3, p. 263 - 272, set/ dez. 2008.



**Figura 1.** Razão de expressão do gene *CHST-1* no osso da cabeça do fêmur de frangos de corte normais e afetados com necrose da cabeça do fêmur, normalizada para os genes de referência *RLP4* e *RLP30*.