

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
UNICENTRO-PR**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA  
CARTILAGEM DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS E  
AFETADOS COM NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR  
AOS 21 DIAS DE IDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARLOS EDUARDO DOS SANTOS**

**GUARAPUAVA-PR**

**2021**

**CARLOS EDUARDO DOS SANTOS**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CARTILAGEM DE FRANGOS DE  
CORTE NORMAIS E AFETADOS COM NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR AOS  
21 DIAS DE IDADE**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Sustentável, para obtenção do título de mestre.

Profa. Dra. Adriana Mércia Guaratini Ibelli  
Orientadora

Profa. Dra. Jane de Oliveira Peixoto  
Coorientadora

**GUARAPUAVA**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA


## Carlos Eduardo dos Santos


*ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CARTILAGEM DE FRANGOS DE CORTE NORMAIS E AFETADOS COM NECROSE DA CABEÇA DO FÊMUR AOS 21 DIAS DE IDADE"*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 30 de agosto de 2021.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Mercia Guaratini Ibelli  
(EMBRAPA-SC)

  
Prof. Dr. Cesar Augusto Pospissil Garbossa  
(UNICENTRO)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lana Teixeira Fernandes  
(EMBRAPA-SC)

GUARAPUAVA-PR  
2021

Dedico a minha esposa Marcella, minha filha Alice, a minha orientadora Adriana, e meus queridos amigos Margarete e Cesar Augusto.

## **AGRADECIMENTOS**

Nesta etapa do mestrado muitas pessoas foram fundamentais para esse processo, dentre elas, não só no mestrado como em toda a minha graduação, a professora Margarete Kimie Falbo que sempre me proporcionou muitas oportunidades para eu melhorar como pessoa e como profissional em Medicina Veterinária.

Agradeço, a minha família, pelo suporte e carinho.

A EMBRAPA e a UNICENTRO.

Ao laboratório de genética e sanidade animal. Aos residentes que ajudaram a desenvolver o experimento.

À minha orientadora por toda a gentileza e tranquilidade com a minha orientação.

Aos meus professores, por compartilhar o melhor em sua área.

A todos que contribuíram de alguma maneira eu os agradeço.

## RESUMO

Carlos Eduardo dos Santos. Análise da expressão gênica da cartilagem de frangos de corte normais e afetados com necrose da cabeça do fêmur aos 21 dias de idade.

O Brasil é o maior exportador de carne de aves no mundo, tendo o terceiro maior plantel dentre todos os países produtores de aves. Problemas locomotores podem afetar diretamente o bem-estar animal diminuindo o conforto das aves de produção, bem como, os índices produtivos. Dentre as patologias, a necrose da cabeça do fêmur está entre as mais frequentes. Apesar da etiologia desta desordem ainda não estar totalmente esclarecida, alguns genes candidatos associados a este problema vêm sendo descobertos. Com o intuito de investigar os genes relacionados ao metabolismo da cartilagem que possam ser importantes para a NCF, objetivou-se identificar genes diferencialmente expressos na cartilagem articular do fêmur de frangos de corte normais e afetados com necrose em um estágio inicial. Neste experimento foram selecionados 25 frangos de corte com 21 dias de idade, sendo 10 normais e 15 com problema locomotor visualmente constatado. Destes, oito animais normais e seis animais afetados com necrose da cabeça do fêmur tiveram a cartilagem femoral coletada, estas foram submetidas para extração de RNA total. Após, a técnica de PCR quantitativa (qPCR) foi utilizada para análise da expressão de 15 genes candidatos, sendo eles: *ADA*, *ANGPTL5*, *AGNPTL7*, *ANK1*, *AVBD2*, *AVBD1*, *COL8A1*, *COL14A1*, *COL28A1*, *DPT*, *EPX*, *FBN2*, *IFI6*, *OPG* e *RHAG*. A análise da expressão diferencial foi realizada utilizando-se a estatística Mann-Whitney no programa GraphPad (Prism8). Cinco genes (*ADA*, *AVBD2*, *RHAG*, *COL28A1* e *ANGPTL7*) apresentaram expressão diferencial significativa entre o grupo de animais normais e afetados a 5% e a 10% de significância. A superexpressão dos genes *ADA*, *AVBD2*, *RHAG*, *COL28A1* e *ANGPTL7* em aves afetadas com NCF indica que genes relacionados à vascularização, inflamação e resposta inata da cartilagem podem estar envolvidos no desenvolvimento dessa desordem em frangos de corte aos 21 dias de idade.

**Palavras-chave:** BCO, necrose da cabeça do fêmur, qPCR.

## ABSTRACT

Carlos Eduardo dos Santos. Gene expression analysis in cartilage of broilers normal and affected with femoral head separation at 21 days of age.

Brazil is the largest poultry exporter worldwide, with third largest breeding stock among all poultry producing countries. Locomotor problems can directly affect animal welfare by decreasing production and the comfort of animals. The main locomotor problems that affect broilers are Femoral Head Necrosis (FHN) also known as, Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO). Although the etiology of this disorder is still unclear, some candidate genes associated with this problem have been described. In order to investigate the genes related to cartilage involved with FHS, the aim of this study was to identify differentially expressed genes in the articular cartilage of the normal and affected broilers at 21 days of age. 25 broilers with 21 days of age, 10 normal and 15 with visually locomotor problem. Out of those, the articular cartilage of 8 normal and 6 FHS-affected were collected for total RNA extraction. The quantitative PCR (qPCR) then used to analyze the expression of 15 candidate genes: *ADA*, *ANGPTL5*, *AGNPTL7*, *ANK1*, *AVBD2*, *AVBD1*, *COL8A1*, *COL14A1*, *COL28A1*, *DPT*, *EPX*, *FBN2*, *IFI6*, *OPG* and *RHAG*. The statistical analysis was performed using Mann-Whitney test in the GraphPad program (Prism8). Five genes (*ADA*, *AVBD2*, *RHAG*, *COL28A1* and *ANGPTL7*) were upregulated in FHS-affected compared to normal and group. At this earlier age, these results reinforce those genes as candidates to trigger FHN in chickens. Furthermore, the *ADA* and *ANGPTL7* function in FHN should be further investigated in a larger population to verify their role in this condition. These results could also contribute to improve the knowledge on FHN etiology in other species, such as horse and pigs that are severely affect by bone disorders.

**Keywords:** BCO, femoral head necrosis, qPCR



## LISTA DE TABELAS

<b>Appendix A1.</b> Primers for candidate genes used in the qPCR of femoral articular cartilage of broilers.....	41
<b>Appendix A2.</b> Bone integrity traits of broilers normal and affected with lameness at 21 days of age.....	42

## LISTA DE FIGURAS

### Referencial Teórico

<b>Figura 1.</b> Diagrama da extremidade proximal da tíbia de um frango normal e um frango com CBO. Nota-se a diferença de penetração de vasos sanguíneos metafisários. O sombreado representa diferenças na expressão gênica associados à hipertrofia de condrócitos.....	16
--	----

### Capítulo 1

<b>Figure 1.</b> Relative expression performed in the femoral articular cartilage from broilers normal and FHS-affect at 21 days of age. ** $p < 0.05$ e * $p = 0.06$ .....	30
<b>Appendix A3.</b> Ontologies (biological processes, cell component and molecular functions) attributed for differentially expressed genes between normal and FHS-affected broilers.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DT</b>	Discondroplastia tibial
<b>NCF</b>	Necrose da cabeça do fêmur
<b>BCO</b>	<i>Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis</i>
<b>ASF</b>	Febre suína africana
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>ADA</b>	Adenosina deaminase
<b>AVBD2</b>	<i>Avian B-Defensins 2</i>
<b>RHAG</b>	<i>Rhesus Blood Group-Associated Glycoprotein</i>
<b>COL28A1</b>	Colágeno Tipo 28 Cadeia Alfa 1
<b>ANGPTL7</b>	<i>Angiopoietin Like 7</i>
<b>FHN</b>	Femoral head necrosis
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>P</b>	Fósforo
<b>Zn</b>	Zinco
<b>Cz</b>	Cinzas
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>RNA-seq</b>	<i>RNA sequencing</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DE</b>	Diferencialmente expressos
<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>STRING</b>	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes</i>
<b>NH<sub>4</sub></b>	Amônio
<b><sup>14</sup>CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	Methylammonium

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Avicultura no Brasil .....	14
2.2. Problemas Locomotores Correlacionados a Genética e a Produção Animal.....	14
2.3. Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF) ou Condronecrose Bacteriana com Osteomielite (BCO) .....	15
2.4 Genes Candidatos a Necrose da cabeça do fêmur .....	16
Adenosina Deaminase ( <i>ADA</i> ).....	17
Avian B-Defensins 2 ( <i>AVBD2</i> ) .....	17
<i>RH Associated Glycoprotein (RHAG)</i> .....	18
Colágeno Tipo 28 Cadeia Alfa 1 ( <i>COL28A1</i> ).....	18
<i>Angiopoietin Like 7 (ANGPTL7)</i> .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
3.1. Objetivos Gerais.....	19
3.2. Objetivos Específicos .....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
4. CAPÍTULO I.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo per capita da carne de frango no Brasil na última década mostra que, em média, consome-se por ano 43,4 kg, sendo que em 2020, o relatório anual da ABPA apresenta um aumento de consumo alcançando os 45,27 kg por pessoa. Por se tratar de uma atividade altamente tecnificada e com alto rendimento de produção é uma alternativa de proteína mais barata e de qualidade para o consumidor brasileiro. Outra alternativa de proteína animal na área de carnes é a suína, no entanto, o consumo per capita é bem menor se comparada a carne de frango sendo de 16 quilos ao ano (ABPA, 2020).

A avicultura de corte é uma atividade de grande importância para o agronegócio brasileiro. Atualmente a média de exportação de carne de frango é de 31% da sua produção e os principais países importadores são Japão, China, México e os que compõem a União Europeia (ABPA, 2020).

O Brasil atualmente destaca-se mundialmente como o maior exportador de frangos (Embrapa, 2021). Nesse contexto, pelo volume produzido e exportado, todos os aspectos produtivos em avicultura que apresentam problemas, representam perdas expressivas de receita às empresas.

O Sul do Brasil, em especial o Paraná, destaca-se como sendo o maior produtor e exportador de carne de frango. Em 2020, este foi responsável por 40,19% das exportações brasileiras e, logo em seguida, o estado de Santa Catarina com 23,39% das exportações. Juntamente com o Rio Grande do Sul, esses três estados representam 80% de toda a exportação brasileira para este mesmo ano (Embrapa, 2021). Devido à grande importância econômica da atividade tanto para o setor do agronegócio brasileiro como também para os produtores que recebem por resultados nos lotes, estudos relacionados à melhoria na produção se tornam cada vez mais essenciais. Além disso, a exigência dos consumidores por produtos de qualidade tem se tornado cada vez mais evidente.

O melhoramento genético é responsável pela precocidade entre o peso de abate e idade do animal, o que trouxe alta proporção músculo esquelética, utilização de ração com eficiência, além de garantir alta taxa de sobrevivência. O surgimento do frango comercial que apresenta essas características ocorreu principalmente no final da segunda guerra mundial (CANEVER et al., 1997).

Estima-se que a taxa de crescimento dos frangos aumentou mais de 400 % no período de 1957 a 2005 e, ao mesmo tempo, houve uma melhora simultânea de 50 % na taxa de conversão alimentar. Como consequência, os frangos modernos sofreram grandes mudanças genéticas e fenotípicas (ZUIDHOF, et al. 2014).

Tem se observado que o rápido desenvolvimento muscular dos frangos não foi seguido pelo desenvolvimento ósseo e problemas de integridade óssea passaram a ser frequentemente observados nos sistemas intensivos de criação de frangos de corte no mundo inteiro (CORR, et al., 2000).

Dentre os principais problemas locomotores em frangos de corte estão discondroplastia tibial (DT), rotação da perna (*valgus-varus*), necrose da cabeça do fêmur (NCF), também conhecida como condronecrose bacteriana com osteomielite (Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis – BCO), espondilite enterocócica, osteoporose, fraturas de fêmur, asas e ossos da pelve (DINEV, 2009).

A BCO/NCF é a causa mais comum de claudicação e impacta negativamente na produção de frangos de corte, afetando cerca de 1,5% dos frangos abatidos aos 42 dias idade nos Estados Unidos (MCNAMEE e SMYTH, 2000). Ela é caracterizada pelo desprendimento completo das placas de crescimento subjacentes, comumente na cabeça do fêmur. Devido a etiologia desta desordem ainda não estar esclarecida, se faz necessário a realização de estudos relacionados aos possíveis genes associados a este problema, o que podem elucidar a fisiopatologia da doença (ORLANDO et al., 2013).

Desta forma, sabendo da importância dos problemas locomotores na avicultura de corte comercial e seu impacto econômico, o objetivo do estudo foi analisar a expressão de possíveis genes envolvidos na manifestação da necrose da cabeça do fêmur na cartilagem de frangos de corte aos 21 dias de idade.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Avicultura no Brasil**

O Brasil é o maior exportador de carne de frango e possui a terceira maior produção de aves no mundo, sendo os EUA o maior produtor seguido pela China (ABPA, 2020).

É provável que o Brasil estabeleça outro recorde na produção e exportação de frangos em 2020, apesar das incertezas atuais em torno do impacto do coronavírus (COVID-19) na economia mundial o país se mantém em posição favorável. A projeção é que a produção cresça 3,2% e estabeleça um recorde de 14,1 milhões de toneladas, já as exportações podem atingir um recorde de quase 4,1 milhões de toneladas (ABPA, 2020).

O principal fator do aumento na produção é a demanda constante por carne de frango, principalmente da Ásia, mas também de outros mercados tradicionais brasileiros, devido à combinação de surtos da Peste Suína Africana (ASF) e da Gripe Aviária na Ásia e em outras partes do mundo (USDA, 2020).

O Brasil está bem posicionado para suprir a demanda mundial, pois além do rigoroso controle sanitário a produção nacional aumenta a cada ano. Prevê-se também que a demanda doméstica aumente devido ao crescimento econômico contínuo, embora em um nível inferior ao inicialmente projetado (USDA, 2020).

### **2.2. Problemas Locomotores Correlacionados a Genética e a Produção Animal**

O bem-estar animal em avicultura é mais comumente observado na prática quando as aves possuem boa habilidade em caminhar, bons aprumos e pés e pernas saudáveis. Ao contrário disso, em conflito, há os objetivos para a produção comercial que não obedecem às práticas necessárias para o bem-estar animal sendo que algumas linhagens podem apresentar problemas de saúde que, por exemplo, causem dor (SOUZA, 2016).

Apesar das altas taxas de crescimento e ganho de peso das aves alcançadas nos últimos anos, proporcionadas pelo ótimo controle de climatização, baixo desafio sanitário e criação em boas condições de manejo geral, acredita-se que tais taxas de crescimento elevadas tenham sido fatores chaves para o aumento dos problemas locomotores (KAPELL et al., 2012).

As patologias de pernas em geral e a claudicação são problemas proeminentes em relação ao bem-estar animal, além de gerar perdas econômicas para os produtores de frangos (GRANQUIST et al., 2019). A claudicação em aves comerciais é um dos primeiros parâmetros a serem considerados quando se avalia o bem-estar animal e animais livre de dor.

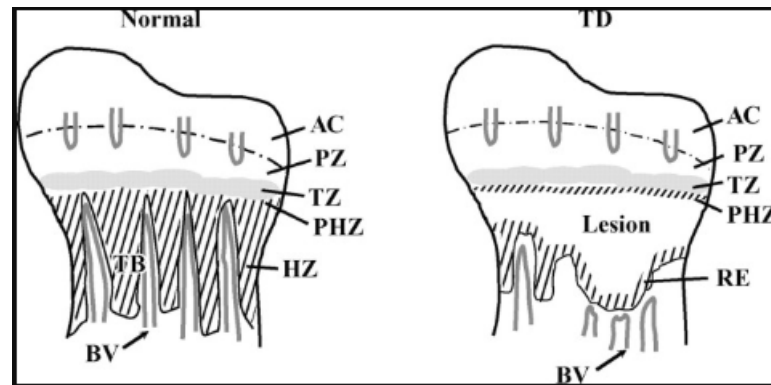
O aparecimento de animais com crescimento atrasado e a necessidade de eliminação de refugos podem estar relacionados a dificuldade dos animais em se alimentarem e ingerirem água e, isso conseqüentemente, afeta de forma negativa o bem-estar animal (GRANQUIST et al., 2019).

A claudicação em aves pode ter um número variado de causas incluindo a infecção viral e bacteriana dos ossos e cartilagens. Dentre elas, (NCF) ou (BCO) é reconhecida como um importante fator de claudicação em aves comerciais (McNAMEE et al., 1998; JIANG et al., 2015).

As linhagens de frango comercial podem apresentar diferenças no grau de acometimento por problemas locomotores como a claudicação, porém não foi observada diferença de acometimento entre machos e fêmeas de uma mesma linhagem (WIDEMAN et al., 2012).

### **2.3. Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF) ou Condronecrose Bacteriana com Osteomielite (BCO)**

A NCF ou BCO ocorre principalmente em frangos de crescimento rápido sendo frequentemente associado a claudicação, com prejuízo para o bem-estar das aves e com significantes perdas econômicas (McNAMEE e SMYTH, 2000). É caracterizada pela separação de epífise da cartilagem articular, necrose trabecular e ultimamente fratura do osso subcondral e, isso pode ser dividido em separação da cabeça do fêmur ou separação da cabeça do fêmur com laceração dependendo da severidade (DURAIRAJ et al., 2009). Esta condição, afeta não só aves como também humanos, suínos, bovinos, equinos e cães a qual está associada a osteocondrose resultado de defeitos vasculares (YTREHUS, CARLSON e EKMAN, et al., 2007)



**Figura 2.** Diagrama da extremidade proximal da tíbia de um frango normal e um frango com CBO. Nota-se a diferença de penetração de vasos sanguíneos metafisários. O sombreado representa diferenças na expressão gênica associados à hipertrofia de condrócitos. Abreviações: AC – Cartilagem articular, PZ – Zona proliferativa, TZ – Zona de transição, PHZ – Zona pré-hipertrófica, BV – Vasos Sanguíneos metafiseais, TB – Osso trabecular, RE - borda de reabsorção. Adaptado de Leach e Monsonego-Ornan (2007).

A epífise femoral obtém o seu suprimento de sangue através de uma única artéria com limitado influxo de sangue colateral. Todavia, uma interrupção do fluxo sanguíneo para a placa de crescimento pode interferir na oferta de nutrientes, assim, afetando a integridade tecidual, coesão e sobrevivência celular, levando a separação do tecido (HOFSTAETTER et al., 2006; SAMBROOK, 2006). Desta forma, estudos visando entender o desenvolvimento dessa separação do osso e cartilagem são essenciais para a compreensão das causas que desencadeiam a BCO/NCF. Além disso, seria interessante avaliar a presença de microrganismos oportunistas em BCO e investigar os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos (WIDEMAN et al., 2013).

#### 2.4 Genes Candidatos a Necrose da cabeça do fêmur

O avanço da genômica tem contribuído para decifrar parte do controle genético das características que a indústria avícola almeja.

Em aves, são raras as populações animais para estudo genômico, provavelmente pelas empresas de genética avícola não disponibilizar seus achados com relação ao assunto (PEIXOTO et al., 2011). Alguns estudos já demonstraram que existe um componente genético relacionado a problemas ósseos, com herdabilidades estimadas como moderada ( $h^2=0,4$ ) (BISHOP et al., 2000).



Em frangos de corte, a seleção por animais menos susceptíveis a problemas ósseos resultou na diminuição deste problema (MANDOUR et al., 1989). Entretanto, dado que as características relacionadas a integridade do osso são de difícil mensuração, há a dificuldade em se melhorar essas características pelos métodos tradicionais de melhoramento genético.

Por isso, a utilização de técnicas de biologia molecular tem auxiliado na descoberta de genes relacionados as características ósseas em aves, e várias regiões do genoma já foram associadas (ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2007a; ZHOU et al., 2007b). Além disso, estudos de genes candidatos (BENNETT, HESTER e SPURLOCK, 2006) e de sequenciamento de transcriptoma (PEIXOTO et al., 2019) também têm sido realizados visando entender os mecanismos biológicos envolvidos com problemas locomotores.

Recentemente, alguns trabalhos identificaram genes candidatos envolvidos na manifestação da necrose da cabeça do fêmur em aves de corte de diferentes idades (PEIXOTO et al., 2019, Hul 2021). Alguns genes considerados candidatos são apresentados a seguir.

### **Adenosina Deaminase (ADA)**

É uma enzima que catalisa a conversão de adenosina em inosina, e regula as concentrações extracelulares de adenosina e inosina em mamíferos. Ela também atua como um regulador endógeno da resposta imune inata, atuando como uma importante função na proliferação e diferenciação de linfócitos T (BOIAGO et al, 2016).

A redução sérica da atividade de *ADA* pode contribuir para restringir a resposta inflamatória e a subsequente lesão celular por causa do possível aumento tecidual de Adenosina, uma molécula anti-inflamatória (ABBRACCHIO e CERUTI, 2007). A diminuição do *ADA* tem sido relacionada a doenças por parasitos e bactérias, modulando a inflamação e a resposta imune (ISIK, KARAMAN e KIRAN et al., 2011).

### **Avian B-Defensins 2 (AVBD2)**

Foram identificados 14 *AvBD* (*AvBD1* a *AvBD14*) em frangos (LYNN et al., 2007). Há atividade antimicrobiana de *AvBD2*, 4, 6, 7 e 13 para *E. coli* segundo Lee et al., (2016). A atividade antimicrobiana de *AvBD2*, extraídas de leucócitos de frango, mostraram propriedades ativas contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Candida Albicans* (HARWIG et al., 1994)

Segundo Derache et al. (2009), a expressão de *AvBD 1,2 e 7* foram identificadas na medula óssea de frangos, sugerindo que leucócitos podem estar envolvidos na síntese de *AVBDs*.

### ***RH Associated Glycoprotein (RHAG)***

O gene *RHAG* (Rhesus Blood Group-Associated Glycoprotein), localizado no cromossomo de galinhas, codifica uma proteína específica de eritrócitos, sendo parte de canais de membrana de transporte de amônio e dióxido de carbono (GENECARDS, 2021). Este gene ainda é pouco estudado e sua função no desenvolvimento de doenças ósseas não é conhecido. No entanto, em outras espécies como ratos e camundongos a super expressão deste gene tem sido associada a doenças de cartilagem, como por exemplo, artrite reumatoide (FAN et al., 2018; KUDRYAVTSEVA et al., 2012).

### **Colágeno Tipo 28 Cadeia Alfa 1 (*COL28A1*)**

A família vertebrada de colágenos contém mais de 40 genes (MYLLYHARJU et al., 2004). O último deles, o tipo XXVIII, assemelha-se a um filamento frisado formando colágeno (VEIT et al., 2006). A participação de receptores de colágeno na adesão e migração de células inflamatórias é conhecida há algum tempo, porém, novas informações conectam a função do receptor a imunidade inata e a tolerância imunológica ao colágeno (HEINO, 2007). Além disso, a variação em ambos receptores e colágenos podem contribuir para a patogênese de doenças comuns como as osteoartroses e trombooses vasculares (HEINO, 2007).

### ***Angiopoietin Like 7 (ANGPTL7)***

A família das proteínas semelhantes a angiopoetinas é composta por proteínas que compartilham uma estrutura homóloga com as angiopetinas, as quais, são conhecidas por serem cruciais na modulação da angiogênese (KATOH e KATOH, 2006). Todos os membros da família ANGPTL são conhecidas por regular a angiogênese (GALAUP et al., 2006). Em humanos ANGPTL7 é expressa em tecidos neurais, córneas e redes trabeculares (KUCHTEI et al., 2008).

Desta forma, sabendo que há componentes genéticos associados ao desenvolvimento dos problemas locomotores e que a necrose da cabeça do fêmur está entre umas das principais condições envolvidas no desenvolvimento destes

problemas, é necessário entender quais os genes e mecanismos genéticos estão envolvidos com esta condição.

Em geral, os estudos disponíveis avaliaram apenas amostras de osso do fêmur, no entanto, há necessidade de se entender o que acontece na cartilagem para que haja o aparecimento da necrose da cabeça do fêmur.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Analisar a expressão de genes candidatos na cartilagem de frangos de cortes normais e afetados com necrose da cabeça do fêmur.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar o nível de expressão de 15 genes candidatos na placa de crescimento do fêmur de frangos de corte COBB 500 aos 21 dias de idade afetados ou não com necrose da cabeça do fêmur;
- Analisar a interação entre os genes candidatos avaliados neste estudo e suas relações com necrose da cabeça do fêmur.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. P1 receptors and cytokine secretion. **Purinergic signalling**, v. 3, n. 1-2, p. 13-25, 2007.

ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em: <<http://abpa-br.org/>>. Acesso em: 15 set. 2020.

BENNETT, A. K.; HESTER, P. Y.; SPURLOCK, D. E. M. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer–broiler cross in chickens. **Animal genetics**, v. 37, n. 3, p. 283-286, 2006.

BISHOP, S. C., FLEMING, R. H., MCCORMACK, H. A., FLOCK, D. K., & WHITEHEAD, C. C. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science**, v. 41, n. 1, p. 33-40, 2000.

BOIAGO, M. M., BALDISSERA, M. D., DOLESKI, P. H., BOTTARI, N. B., DO CARMO, G. M., ARAUJO, D. N., ... & WISSER, C. S. Ectonucleotidases and adenosine deaminase activity in laying hens naturally infected by Salmonella Gallinarum and their effects on the pathogenesis of the disease. **Microbial pathogenesis**, v. 93, p. 180-184, 2016.

DAWKINS, M. S.; LAYTON, R. Breeding for better welfare: genetic goals for broiler chickens and their parents. **Animal Welfare-The UFAW Journal**, v. 21, n. 2, p. 147, 2012.

DERACHE, C., LABAS, V., AUCAGNE, V., MEUDAL, H., LANDON, C., DELMAS, A. F., ... & LALMANACH, A. C. Primary structure and antibacterial activity of chicken bone marrow-derived  $\beta$ -defensins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4647-4655, 2009.

DINEV, I. Clinical and morphological investigations on the prevalence of lameness associated with femoral head necrosis in broilers. **British poultry science**, v. 50, n. 3, p. 284-290, 2009.

DURAIRAJ, V., OKIMOTO, R., RASAPUTRA, K., CLARK, F. D., & RATH, N. C. Histopathology and serum clinical chemistry evaluation of broilers with femoral head separation disorder. **Avian diseases**, v. 53, n. 1, p. 21-25, 2009.

- FAN, Q., LIU, Z., SHEN, C., LI, H., DING, J., JIN, F., ... & ZHANG, Z. Microarray study of gene expression profile to identify new candidate genes involved in the molecular mechanism of leptin-induced knee joint osteoarthritis in rat. **Hereditas**, v. 155, n. 1, p. 4, 2018.
- GALAUP, A., CAZES, A., LE JAN, S., PHILIPPE, J., CONNAULT, E., LE COZ, E., ... & MONNOT, C. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 49, p. 18721-18726, 2006.
- GRANQUIST, E. G., VASDAL, G., DE JONG, I. C., & MOE, R. O. Lameness and its relationship with health and production measures in broiler chickens. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2365-2372, 2019.
- HEINO, J. The collagen family members as cell adhesion proteins. **Bioessays**, v. 29, n. 10, p. 1001-1010, 2007.
- HOFSTAETTER, J. G., WANG, J., YAN, J., & GLIMCHER, M. J. Changes in bone microarchitecture and bone mineral density following experimental osteonecrosis of the hip in rabbits. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 138-147, 2006.
- ISIK, S., KARAMAN, U., & KIRAN, T. R. Serum Adenosine deaminase (ADA) levels in surgically treated hydatid cyst patients. **Scientific Research and Essays**, v. 6, n. 14, p. 3101-3103, 2011.
- JIANG, T., MANDAL, R. K., WIDEMAN JR, R. F., KHATIWARA, A., PEVZNER, I., & KWON, Y. M. Molecular survey of bacterial communities associated with bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (BCO) in broilers. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124403, 2015.
- KAPPELL, D. N. R. G., HILL, W. G., NEETESON, A. M., MCADAM, J., KOERHUIS, A. N. M., & AVENDANO, S. Twenty-five years of selection for improved leg health in purebred broiler lines and underlying genetic parameters. **Poultry science**, v. 91, n. 12, p. 3032-3043, 2012.
- KATOH, Y.; KATOH, M. Comparative integromics on Angiopoietin family members. **International journal of molecular medicine**, v. 17, n. 6, p. 1145-1149, 2006.

KUCHTEY, J., KÄLLBERG, M. E., GELATT, K. N., RINKOSKI, T., KOMAROMY, A. M., & KUCHTEY, R. W. Angiopoietin-like 7 secretion is induced by glaucoma stimuli and its concentration is elevated in glaucomatous aqueous humor. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 49, n. 8, p. 3438-3448, 2008.

KUDRYAVTSEVA, E., FORDE, T. S., PUCKER, A. D., & ADARICHEV, V. A. Wnt signaling genes of murine chromosome 15 are involved in sex-affected pathways of inflammatory arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 4, p. 1057-1068, 2012.

LEACH JR, R. M.; MONSONEGO-ORNAN, E. Tibial dyschondroplasia 40 years later. **Poultry Science**, v. 86, n. 10, p. 2053-2058, 2007.

LEE, M. O., JANG, H. J., RENGARAJ, D., YANG, S. Y., HAN, J. Y., LAMONT, S. J., & WOMACK, J. E. Tissue expression and antibacterial activity of host defense peptides in chicken. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 231, 2016.

LYNN, D. J., HIGGS, R., LLOYD, A. T., O'FARRELLY, C., HERVÉ-GRÉPINET, V., NYS, Y., ... & ZHANG, G. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. **Immunology letters**, v. 110, n. 1, p. 86-89, 2007.

MANDOUR M.A., NESTOR K.E., SACCO R.E., POLLEY C.R., HAVENSTEIN G.B. Genetic parameter estimates for wing bone strength measurements of cage-reared broilers. **Poultry Science** 1989;68:1174-1178

MCNAMEE, P. T., MCCULLAGH, J. J., THORP, B. H., BALL, H. J., GRAHAM, D., MCCULLOUGH, S. J., ... & SMYTH, J. A. Study of leg weakness in two commercial broiler flocks. **Veterinary Record**, v. 143, n. 5, p. 131-135, 1998.

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

MYLLYHARJU, J; KIVIRIKKO, K. I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 1, p. 33-43, 2004.

ORLANDO, B., GIACOMELLI, L., RICCI, M., BARONE, A., & COVANI, U. Leader genes in osteogenesis: a theoretical study. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 1, p. 42-49, 2013.

PEIXOTO, J. D. O., TESSMANN, A. L., SAATKAMP, M. G., MURARI, D., & LEDUR, M. População referência para validação de estudos genômicos e descoberta de genes

em frango de corte. In: Embrapa Suínos e Aves. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 48., 2011, Belém. Anais...1 CD-ROM., 2011.

PEIXOTO, J. de O.; IBELLI, A. M. G.; LEDUR, M. C. Informações genômicas podem ajudar a reduzir problemas metabólicos em frangos de corte. **Avicultura Industrial**, Itu, ed. 1293, ano 111, n. 10, p. 14-19, 2019.

SAMBROOK, P. N. Glucocorticoid-induced osteoporosis. In: **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**, 6th ed. M.J. Favus, ed. American Society of Bone and Mineral Research, Washington, DC. pp. 296–302. 2006.

STEVENSON, R.; SILVER, S. Methylammonium uptake by *Escherichia coli*: evidence for a bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 75, n. 4, p. 1133-1139, 1977.

USDA – **United States Department of Agriculture**. Brazil: Poultry and Products Semi-annual. Report Number: BR2020-0007, 2020. Disponível em: <[https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Poultry%20and%20Products%20Semi-annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_03-01-2020](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Poultry%20and%20Products%20Semi-annual_Brasilia_Brazil_03-01-2020)>. Acesso em: 15 set. 2020.

VEIT, Guido et al. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3494-3504, 2006.

VON MERING, C., JENSEN, L. J., SNEL, B., HOOPER, S. D., KRUPP, M., FOGIERINI, M., ... & BORK, P. STRING: known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl 1, p. D433-D437, 2005.

WIDEMAN JR, R. F., HAMAL, K. R., STARK, J. M., BLANKENSHIP, J., LESTER, H., MITCHELL, K. N., & PEVZNER, I. A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. **Poultry science**, v. 91, n. 4, p. 870-883, 2012.

WIDEMAN JR.; R. F.; PRISBY, R. D. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, p. 183, 2013.

WIJESURENDRA, D. S., CHAMINGS, A. N., BUSHELL, R. N., ROURKE, D. O., STEVENSON, M., MARENDA, M. S., ... & STENT, A. Pathological and microbiological investigations into cases of bacterial chondronecrosis and osteomyelitis in broiler poultry. **Avian pathology**, v. 46, n. 6, p. 683-694, 2017.

YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 4, p. 429-448, 2007.

ZHOU, H., DEEB, N., EVOCK-CLOVER, C. M., ASHWELL, C. M., & LAMONT, S. J. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. II. Body composition. **Poultry science**, v. 85, n. 10, p. 1712-1721, 2006.

ZHOU, H., DEEB, N., EVOCK-CLOVER, C. M., MITCHELL, A. D., ASHWELL, C. M., & LAMONT, S. J. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. III. Skeletal integrity. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 255-266, 2007a.

ZHOU, H., EVOCK-CLOVER, C. M., MCMURTRY, J. P., ASHWELL, C. M., & LAMONT, S. J. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. IV. Metabolic traits. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 267-276, 2007b.

ZHOU, J., YE, S., FUJIWARA, T., MANOLAGAS, S. C., & ZHAO, H. 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30064-30074, 2013.



#### 4. CAPÍTULO I

*Artigo submetido ao periódico Research in Veterinary Science*

Upregulation of *AvBD2*, *RHAG* and *COL28A1* genes in broilers affected with femoral head separation at 21 days of age

Carlos Eduardo Santos<sup>a+</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>a,b+</sup>, Lana Teixeira Fernandes<sup>b+</sup>, Débora Ester Petry Marcelino<sup>c</sup>, Vicky Lilge Kowski<sup>b</sup>, Fernanda Tonello Neis<sup>d</sup>, Mônica Corrêa Ledur<sup>b,e</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 85040-080, Guarapuava, Paraná, Brazil.

<sup>b</sup>Embrapa Suínos e Aves, 89715-899, Concórdia, Santa Catarina, Brazil.

<sup>c</sup>Faculdade de Concórdia FACC, 89701-130, Concórdia, Santa Catarina, Brazil.

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, 89815-630, Chapecó, Santa Catarina, Brazil.

<sup>e</sup>Instituto Federal Catarinense, 89703-720, Concórdia, Santa Catarina, Brazil

\*These authors contributed equally to this work

#### **Authors' e-mail addresses**

Adriana Mércia Guaratini Ibelli: [adriana.ibelli@embrapa.br](mailto:adriana.ibelli@embrapa.br)

Carlos Eduardo Santos: [carlosedu\\_8@yahoo.com.br](mailto:carlosedu_8@yahoo.com.br)

Débora Ester Petry Marcelino: [deboraester.agro@gmail.com](mailto:deboraester.agro@gmail.com)

Fernanda Tonello Neis: [fernandatoneis@outlook.com](mailto:fernandatoneis@outlook.com)

Jane de Oliveira Peixoto: [jane.peixoto@embrapa.br](mailto:jane.peixoto@embrapa.br)

Lana Teixeira Fernandes: [lanatf@yahoo.fr](mailto:lanatf@yahoo.fr)

Mônica Corrêa Ledur: [monica.ledur@embrapa.br](mailto:monica.ledur@embrapa.br)

Vicky Lilge Kowski: vicky.kowski@embrapa.br

**\*Corresponding author**

Embrapa Swine and Poultry National Research Center

Animal Health and Genetics Laboratory

BR 153, Km 110, Distrito de Tamanduá

89715-899, Concórdia, Santa Catarina, Brazil.

[adriana.ibelli@embrapa.br](mailto:adriana.ibelli@embrapa.br)

**Abstract**

Femoral head necrosis (FHN) is one of the most common condition in fast growing broilers, being characterized by separation of articular cartilage from epiphysis and classified as femoral head separation (FHS) or FHS with laceration (FHSL) depending on severity. Although molecular mechanisms involved with this disorder have been observed, its etiology is still unclear. Therefore, the expression of 15 candidate genes, chosen based on previous transcriptomic studies, was evaluated in the articular cartilage (AC) of normal and FHS-affected broilers at 21 days of age. Samples were collected based on the absence or presence of FHS for physical-chemical and qPCR analysis. The *AvBD2*, *RHAG*, *COL28A1*, *ADA* and *ANGPTL7* were upregulated in FHS-affected broilers compared to the healthy group. These genes are involved in immune response, defense against pathogens, inflammation, cellular migration and adhesion, indicating different molecular mechanisms to control FHS progression at early age. Our results can contribute to improve the knowledge on FHN etiology in chickens and other species, such as horse and pigs that are severely affected by bone disorders.

**Keywords:** femoral head necrosis, gene expression, chickens, qPCR

## **Main text**

The genetic progress in broilers performance in the last decades has been correlated with the appearance of undesirable effects on physiological traits, including increased skeletal defects and metabolic disorders (Julian, 1998; Tallentire et al., 2016). Nowadays, bone disorders are the most important production problems in intensive broiler systems worldwide (Bradshaw et al., 2002; Julian, 1998), leading to economic losses and welfare concerns (de Jong et al., 2012). Femoral head necrosis (FHN) is one of the main locomotor problems in broilers (Dinev, 2009), causing lameness and negative impacts in production (Wideman and Prisby, 2013). This condition is also known as bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (BCO), especially when involves bacterial infection (Mandal et al., 2016). Although its etiology is still unclear, there are studies suggesting possible genes and molecular mechanisms involved with femur injuries (Hul et al., 2021; Li et al., 2015; Paludo et al., 2017; Peixoto et al., 2019; Petry et al., 2018). Recent transcriptome studies of femur growth plate (GP) and articular cartilage (AC) have evidenced genes associated to femoral head separation (FHS) in 35 days-old broilers (Hul et al., 2021; Peixoto et al., 2019). FHS is the separation of the AC from the GP, which is considered a risk factor for BCO occurrence in broilers (Packialakshmi et al., 2015). Since a set of candidate genes for FHS has already been identified in transcriptome studies in broilers with 35 days of age, a younger age was selected to verify whether these genes had their expression profile also changed at 21 days of age, which could be more related to the onset of this

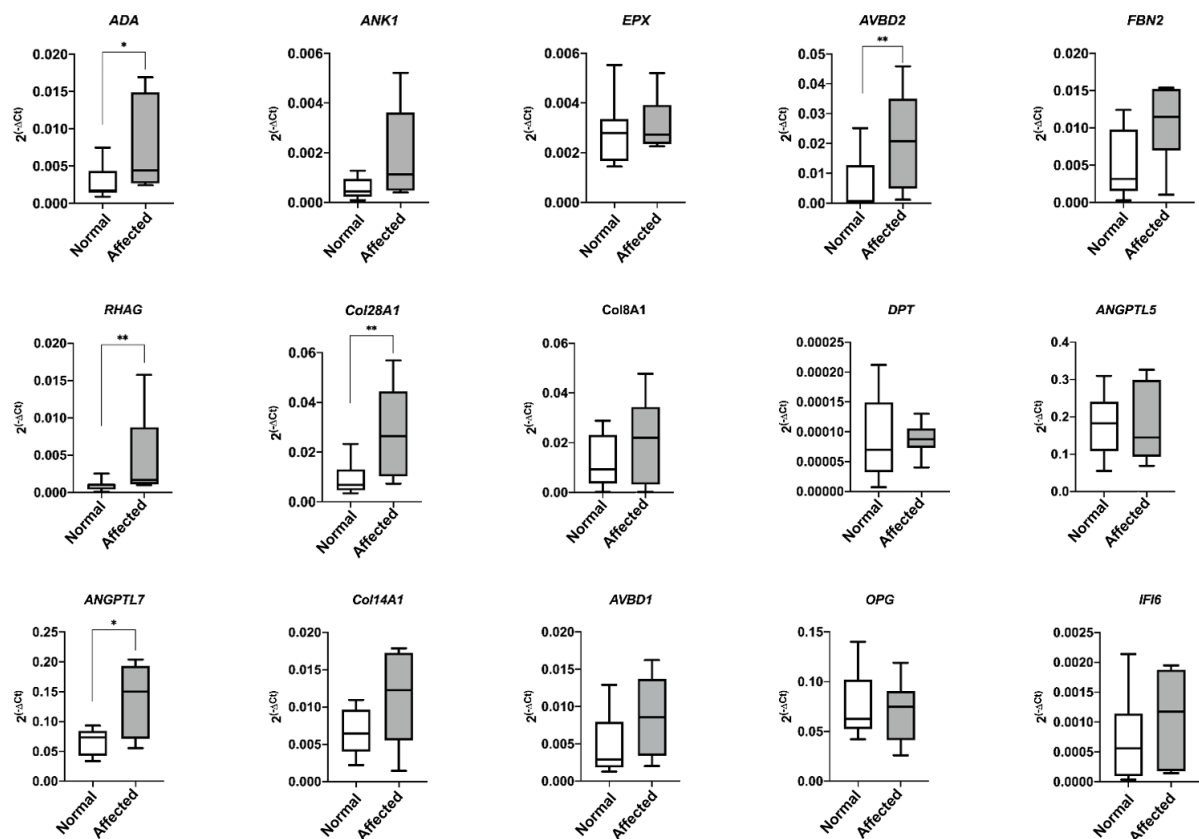
condition. This is important to verify early stages of FHN, when animals only presented femoral head separation. Therefore, in this study, the expression of candidate genes involved with FHS was evaluated in the AC of broilers at an early age: 21 days. To this, 25 male Cobb500 commercial broilers from the same farm in Concordia, SC, Brazil were used to ensure similar nutritional and management conditions. They were chosen based on their walking ability: normal or with lameness, transported to Embrapa Suínos e Aves, weighted and euthanized by cervical dislocation. After necropsy, animals were evaluated and classified according to the absence or presence of FHS (Packialakshmi et al., 2015; Paludo et al., 2017; Wideman and Prisby, 2013). Samples of the normal group presented good adhesion of AC and GP, while those from FHS-affected group presented easy detachment between AC and GP. The femur was collected for physical-chemical analysis (bones' weight, length and thickness, calcium (Ca), Zinc (ZN) and phosphorus (P) content, Ca:P ratio, dry matter, ashes and breaking strength), evaluated as described by Cruz et al. (2015). Statistical analysis was performed using a t-test for group comparison with  $p \leq 0.05$  considered significant.

For quantitative gene expression (qPCR) analysis, AC from 8 normal and 6 FHS-affected samples were collected and frozen immediately. 100 mg AC was grinded in a mortar and added to 1 mL Trizol Reagent (Invitrogen, USA) for RNA extraction, following the manufacturer' protocol. Total RNA was quantified in BioDrop spectrophotometer (Biodrop, UK) and samples with OD260:OD280 ratio greater than 1.9 were used. RNA integrity was confirmed in 1% agarose gel electrophoresed for 90 min. Three  $\mu\text{g}$  of total RNA was used for cDNA synthesis with SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix Kit (Invitrogen, USA). The 15 candidate genes were chosen based on previous transcriptome studies (Hul et al., 2021; Peixoto et al., 2019): avian beta-defensin 1 (*AvBD1*), avian beta-defensin 2 (*AvBD2*), *fibrillin 2* (*FBN2*), ankyrin 1 (*ANK1*), collagen type XXVIII alpha 1 chain (*Col28A1*), eosinophil peroxidase

(*EPX*), adenosine deaminase (*ADA*), collagen type XIII alpha 1 chain (*COL13A1*), Rh associated glycoprotein (*RHAG*), collagen type VIII alpha 1 chain (*COL8A1*), interferon alpha inducible protein 6 (*IFI6/ISG12-2*), osteoprotegerin (*OPG/TNFRSF11B*), collagen type XIV alpha 1 chain (*COL14A1*), dermatopontin (*DPT*), angiopoietin like 5 (*ANGPTL5*) and angiopoietin like 7 (*ANGPTL7*). Primers were designed with Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012, Appendix A1) and quality evaluated with Netprimer program (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer>). Samples were submitted to qPCR analysis in the QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, USA) with reactions containing: 1X final concentration GoTaq qPCR Master Mix 2x (Promega, USA), 0.16  $\mu$ M of each F and R primers (Appendix A1), 2  $\mu$ L cDNA at 1:10 dilution, and ultrapure water to 15  $\mu$ L total reaction. qPCR reactions were performed in duplicates, cycle threshold (Ct) values were obtained and transformed into  $2^{-\Delta Ct}$  (Schmittgen and Livak, 2008). To calculate the  $2^{-\Delta Ct}$ , the Ct geometric mean of *RPL5* and *RPLP1* reference genes were used. These genes were chosen since they have already been selected as stable in an articular cartilage study with chickens (Hul et al., 2020). Differential expression analysis was performed using Mann-Whitney statistic considering two thresholds of significance  $p \leq 0.05$  and  $p \leq 0.1$ .

The male broilers average weight at 21 days of age was approximately 850g, with average weight of  $960 \pm 80$  g for the normal and  $770 \pm 220$  g for the lameness group. This difference was significant ( $p=0.008$ ), possibly because lameness broilers had difficulty to access water and feed, since their walking ability was impaired. Considering the morphometric and physical-chemical analyses, the only significant differences observed were for femur weight and thickness, which were lower in FHS-affected than the normal group ( $p \leq 0.05$ ) (Appendix A2).

In the gene expression analysis, all candidate genes were expressed in broiler's femoral head AC at 21 days of age. Out of those, *AvBD2*, *RHAG*, *Col28A1* ( $p < 0.05$ ), *ADA* and *ANGPTL7* ( $p=0.06$ ) were upregulated in FHS-affected compared to the normal broilers (Figure 1). These genes were involved with apoptosis, immune response, ion transport, cell homeostasis, adhesion and hypoxia, mostly with functions related to deaminase, leak channel and binding activities (Appendix A3).



**Figure 1. Relative expression performed in the femoral articular cartilage from broilers normal and FHS-affect at 21 days of age. \*\* $p<0.05$  e \* $p=0.06$**

*RHAG*, *Col28A1* and *AvBD2* code for proteins involved in immune response, such as defense against pathogens, inflammation, cellular migration and adhesion (Lee et al., 2016).

*AvBD2* gene showed the highest expression levels among DE genes: 5.25 (p=0.001) times more expressed in FHS-affected broilers than their healthy counterparts. The AvBD family comprises 14 different genes in chickens (Lynn et al., 2007) coding for defensins, a family of small, cationic peptides with roles in host defense against pathogens (Ganz, 2003). Important antimicrobial activity of AvBD genes has been reported in different chicken tissues challenged with *E. coli*, *Clostridium perfringens* and *Eimeria* species (Hong et al., 2012; Lee et al., 2016; Su et al., 2017). Moreover, bacterial translocation from intestine and consequent proliferation in bone fissures is one of the causes of BCO in broilers (Wideman and Prisby, 2013). Wijesurendra et al. (2017) observed that *E. coli* and *Staphylococcus* were the most identified bacterial isolates in BCO samples. Here, *AvBD2* upregulation could help to counteract a possible bacterial infection and prevent FHS progression into FHN severe levels. Similar results were found by Hul (2021) comparing normal and FHS-affected AC at 35 days, where *AvBD2* was more expressed in the FHS-group.

*RHAG* gene is a solute transporter member of the *SLC42* family, which is involved in oxygen and ammonia transport across erythrocytes membranes (Endeward et al., 2008; Genetet et al., 2012). Recently, *RHAG* expression was found to be significantly lower in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) affected individuals compared with healthy ones (Wu et al., 2021). SONFH is a human chronic disease caused by disruption of the blood supply of the femoral head and subsequent death of bone cells after chronic exposure to glucocorticoids (Wu et al., 2021). *RHAG* upregulation at early age suggests a tentative to reduce hypoxia caused by inflammation and blood supply disruption and it has already been described in femoral AC and bone of 35-days old broilers with FHS (Hul et al., 2021; Peixoto et al.,

2019). These findings indicate that *RHAG* upregulation is part of one of the mechanisms evoked to control FHS progression and BCO development.

*COL28A1*, a member of the collagen family, was 2x more expressed in FSH-affected than in normal broilers. Collagens, especially *COL2A1*, are responsible for cell adhesion and essential for cartilage formation and maintenance (Karamanos et al., 2021). The *COL28A1* gene encodes a filament forming collagen involved in cell adhesion and extracellular matrix (ECM) processes and has been observed at low levels in the proximal femoral head of 35-days old broilers with FHS (Peixoto et al., 2019). Therefore, *COL28A1* upregulation in AC, in contrast with bone, suggests a tentative to preserve the ECM integrity at early ages to avoid AC separation from growth plate in the femur epiphysis.

Finally, *ADA* and *ANGPTL7* were also upregulated in FHS-affected broilers. *ADA* codes for an enzyme that regulates adenosine concentrations and also acts as an endogenous regulator of the innate immune response (Boiago et al., 2016). Reduction of *ADA* activity contributes for restricting inflammatory response and cell damage, because of the increase of adenosine, an anti-inflammatory molecule (Abbracchio and Ceruti, 2007). Furthermore, the *ADA* upregulation favored matrix degradation (Tesch et al., 2004), and joint destruction in rheumatoid arthritis (Bhagavatham et al., 2021). Thus, *ADA* upregulation in FHS-affected broilers could favor inflammation and trigger FHS-development since early ages.

*ANGPTL7* gene acts in angiogenesis, cell adhesion and collagen formation (Comes et al., 2011; Parri et al., 2014). There is a controversy in its function, since it was described as an angiogenesis negative regulator (Peek et al., 2002), but also promoting cell proliferation and vascularization in human cells (Comes et al., 2011;



Parri et al., 2014). Therefore, the *ANGPTL7* overexpression in our study could be involved with the maintenance of matrix and cartilage formation and organization.

The FHS etiology is difficult to be fully depicted as most of other diseases, since the majority of the studies are performed comparing healthy and animals already affected, in a way that causal factors could be manifested previously to its development. Therefore, we have collected samples at a young age and FHS-early stage, trying to obtain molecular mechanisms involved mainly with its onset. With this approach, we showed that *AvBD2*, *RHAG*, *COL28A1*, *ANGPTL7* and *ADA* were upregulated in FHS-affected broilers AC at 21 days of age in comparison with healthy broilers. At this early age, these results show, except for the *ADA* gene, different molecular mechanisms to control FHS progress and, consequently, to avoid the FHN development. These results can contribute to improve the knowledge on FHN etiology in chicken and other species, such as horse and pigs that are severely affected by bone disorders.

## References

- Abbracchio, M.P., Ceruti, S., 2007. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal*. 3, 13. <https://doi.org/10.1007/S11302-006-9033-Z>
- Bhagavatham, S.K.S., Khanchandani, P., Kannan, V., Potikuri, D., Sridharan, D., Pulukool, S.K., Naik, A.A., Dandamudi, R.B., Divi, S.M., Pargaonkar, A., Ray, R., Santha, S.S.R., Seshagiri, P.B., Narasimhan, K., Gumdal, N., Sivaramakrishnan, V., 2021. Adenosine deaminase modulates metabolic remodeling and orchestrates joint destruction in rheumatoid arthritis. *Sci. Reports* 2021 111 11, 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94607-5>

- Boiago, M.M., Baldissera, M.D., Doleski, P.H., Bottari, N.B., do Carmo, G.M., Araujo, D.N., Giuriatti, J., Baggio, V., Leal, D.B.R., Casagrande, R.A., Wisser, C.S., Stefani, L.M., da Silva, A.S., 2016. Ectonucleotidases and adenosine deaminase activity in laying hens naturally infected by *Salmonella Gallinarum* and their effects on the pathogenesis of the disease. *Microb. Pathog.* 93, 180–184. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.02.008>
- Bradshaw, R.H., Kirkden, R.D., Broom, D.M., 2002. A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. *Avian Poult. Biol. Rev.* 13, 45–103. <https://doi.org/10.3184/147020602783698421>
- Comes, N., Buie, L.K., Borrás, T., 2011. Evidence for a role of angiopoietin-like 7 (ANGPTL7) in extracellular matrix formation of the human trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Genes to Cells* 16, 243–259. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2010.01483.X>
- Cruz, V.A.R. da, Schenkel, F.S., Savegnago, R.P., Grupioni, N.V., Stafuzza, N.B., Sargolzaei, M., Ibelli, A.M.G., Peixoto, J. de O., Ledur, M.C., Munari, D.P., 2015. Association of Apolipoprotein B and Adiponectin Receptor 1 Genes with Carcass, Bone Integrity and Performance Traits in a Paternal Broiler Line. *PLoS One* 10, e0136824. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0136824>
- de Jong, I.C., van Harn, J., Gunnink, H., Hindle, V.A., Lourens, A., 2012. Footpad dermatitis in Dutch broiler flocks: Prevalence and factors of influence. *Poult. Sci.* 91, 1569–1574. <https://doi.org/10.3382/PS.2012-02156>
- Dinev, I., 2009. Clinical and morphological investigations on the prevalence of lameness associated with femoral head necrosis in broilers. *Br. Poult. Sci.* 50, 284–290. <https://doi.org/10.1080/00071660902942783>

- Endeward, V., Cartron, J.-P., Ripoche, P., Gros, and G., 2008. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO<sub>2</sub> channel in the human red cell membrane. *FASEB J.* 22, 64–73. <https://doi.org/10.1096/FJ.07-9097COM>
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003 39 3, 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Genetet, S., Ripoche, P., Picot, J., Bigot, S., Delaunay, J., Armari-Alla, C., Colin, Y., Mouro-Chanteloup, I., 2012. Human RhAG ammonia channel is impaired by the Phe65Ser mutation in overhydrated stomatocytic red cells. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00092.2011> 302, 419–428. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00092.2011>
- Hong, Y.H., Song, W., Lee, S.H., Lillehoj, H.S., 2012. Differential gene expression profiles of  $\beta$ -defensins in the crop, intestine, and spleen using a necrotic enteritis model in 2 commercial broiler chicken lines. *Poult. Sci.* 91, 1081–1088. <https://doi.org/10.3382/PS.2011-01948>
- Hul, L.M., Ibelli, A.M.G., Peixoto, J. de O., Souza, M.R., Savoldi, I.R., Marcelino, D.E.P., Tremea, M., Ledur, M.C., 2020. Reference genes for proximal femoral epiphysiolysis expression studies in broilers cartilage. *PLoS One*.
- Hul, L.M., Ibelli, A.M.G., Savoldi, I.R., Marcelino, D.E.P., Fernandes, L.T., Peixoto, J.O., Cantão, M.E., Higa, R.H., Giachetto, P.F., Coutinho, L.L., Ledur, M.C., 2021. Differentially expressed genes in the femur cartilage transcriptome clarify the understanding of femoral head separation in chickens. *Sci. Reports* 2021 111 17965. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97306-3>
- Julian, R.J., 1998. Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers. *Poult. Sci.* 77, 1773–1780. <https://doi.org/10.1093/PS/77.12.1773>

- Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S.S., Vynios, D.H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C.E.H., Duca, L., Durbee, M., Afratis, N.A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., Onisto, M., 2021. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J.* <https://doi.org/10.1111/FEBS.15776>
- Lee, M.O., Jang, H.-J., Rengaraj, D., Yang, S.-Y., Han, J.Y., Lamont, S.J., Womack, J.E., 2016. Tissue expression and antibacterial activity of host defense peptides in chicken. *BMC Vet. Res.* 2016 121 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0866-6>
- Li, P., Zhou, Z., Shi, C., Hou, J., 2015. Downregulation of basic fibroblast growth factor is associated with femoral head necrosis in broilers. *Poult. Sci.* 94, 1052–1059. <https://doi.org/10.3382/PS/PEV071>
- Lynn, D.J., Higgs, R., Lloyd, A.T., O'Farrelly, C., Hervé-Grépinet, V., Nys, Y., Brinkman, F.S.L., Yu, P.L., Soulier, A., Kaiser, P., Zhang, G., Lehrer, R.I., 2007. Avian beta-defensin nomenclature: A community proposed update. *Immunol. Lett.* 110, 86–89. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2007.03.007>
- Mandal, R.K., Jiang, T., Al-Rubaye, A.A., Rhoads, D.D., Wideman, R.F., Zhao, J., Pevzner, I., Kwon, Y.M., 2016. An investigation into blood microbiota and its potential association with Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) in Broilers. *Sci. Reports* 2016 61 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep25882>
- Packialakshmi, B., Rath, N.C., Huff, W.E., Huff, G.R., 2015. Poultry Femoral Head Separation and Necrosis: A Review. *Avian Dis.* 59, 349–354. <https://doi.org/10.1637/11082-040715-review.1>
- Paludo, E., Ibelli, A.M.G., Peixoto, J.O., Tavernari, F.C., Lima-Rosa, C.A.V., Pandolfi,

- J.R.C., Ledur, M.C., 2017. The involvement of RUNX2 and SPARC genes in the bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers. *Animal* 11, 1063–1070. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002433>
- Parri, M., Pietrovito, L., Grandi, A., Campagnoli, S., De Camilli, E., Bianchini, F., Marchiò, S., Bussolino, F., Jin, B., Sarmientos, P., Grandi, G., Viale, G., Pileri, P., Chiarugi, P., Grifantini, R., 2014. Angiopoietin-like 7, a novel pro-angiogenic factor over-expressed in cancer. *Angiogenesis*. 2014 174 17, 881–896. <https://doi.org/10.1007/S10456-014-9435-4>
- Peek, R., Kammerer, R., Frank, S., Otte-Höller, I., Westphal, J., 2002. The angiopoietin-like factor cornea-derived transcript 6 is a putative morphogen for human cornea. *J. Biol. Chem.* 277, 686–693. <https://doi.org/10.1074/JBC.M105746200>
- Peixoto, J.O., Savoldi, I.R., Ibelli, A.M.G., Cantão, M.E., Jaenisch, F.R.F., Giachetto, P.F., Settles, M.L., Zanella, R., Marchesi, J.A.P., Pandolfi, J.R., Coutinho, L.L., Ledur, M.C., 2019. Proximal femoral head transcriptome reveals novel candidate genes related to epiphysiolysis in broiler chickens. *BMC Genomics* 20. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6411-9>
- Petry, B., Savoldi, I.R., Ibelli, A.M.G., Paludo, E., de Oliveira Peixoto, J., Jaenisch, F.R.F., de Córdova Cucco, D., Ledur, M.C., 2018. New genes involved in the Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis in commercial broilers. *Livest. Sci.* 208, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.12.003>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Su, S., Dwyer, D.M., Miska, K.B., Fetterer, R.H., Jenkins, M.C., Wong, E.A., 2017.

- Expression of host defense peptides in the intestine of *Eimeria*-challenged chickens. *Poult. Sci.* 96, 2421–2427. <https://doi.org/10.3382/PS/PEW468>
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Von Mering, C., 2019. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47, D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tallentire, C.W., Leinonen, I., Kyriazakis, I., 2016. Breeding for efficiency in the broiler chicken: A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2016 364 36, 1–16. <https://doi.org/10.1007/S13593-016-0398-2>
- Tesch, A.M., MacDonald, M.H., Kollias-Baker, C., Benton, H.P., 2004. Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. *Osteoarthr. Cartil.* 12, 349–359. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2004.01.002>
- Wideman, R.F., Prisby, R.D., 2013. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 183. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00183>
- Wijesurendra, D.S., Chamings, A.N., Bushell, R.N., Rourke, D.O., Stevenson, M., Marends, M.S., Noormohammadi, A.H., Stent, A., 2017. Pathological and microbiological investigations into cases of bacterial chondronecrosis and osteomyelitis in broiler poultry. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1349872> 46, 683–694. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1349872>

Wu, Z., Wen, Y., Fan, G., He, H., Zhou, S., Chen, L., 2021. HEMGN and SLC2A1 might be potential diagnostic biomarkers of steroid-induced osteonecrosis of femoral head: study based on WGCNA and DEGs screening. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2021 22(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12891-021-03958-7>

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

### **Animal Welfare**

All of the experimental procedures were conducted in accordance of the guidelines of the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) from the Embrapa Swine and Poultry National Research Center, with approval protocol number 012/2012, in agreement with the rules of the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) to ensure compliance with international guidelines for animal welfare.

### **Author contribution**

AMGI, JOP, MCL conceived and designed the experiment. AMGI, LMH, DEPM, CES, FTR, CES performed the experiment. LMH, AMGI, JOP, MCL performed data analysis and curation. AMGI, JOP, MCL and LTF prepared the original draft manuscript. JOP and MCL were responsible for funding acquisition. AMGI, JOP, MCL supervised the research. All authors have read and approved the final manuscript.

### **Declaration of Competing Interest**

There is no conflict of interest to declare.

### **Data availability**

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Funding source**

This study was funded by project #01.11.07.002.04.03 from the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA).

### **Acknowledgements**

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil – Finance Code 001 for the free access to the journals used in the literature review. LTF is supported by a visiting specialist fellowship from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) grant # 380282/2021-6. DEPM and FTR received a PIBIC/CNPq scholarship at Embrapa. MCL and AMGI are CNPq Productivity research fellow.

### **Appendix A. Supplementary data**

**Appendix A1.** Primers for candidate genes used in the qPCR of femoral articular cartilage of broilers.

**Appendix A2.** Bone integrity traits of broilers normal and affected with lameness at 21 days of age.

**Appendix A3.** Ontologies (biological processes, cell component and molecular functions) attributed for DE genes between normal and FHS-affected broilers



## Appendix A.

**Appendix A1.** Primers for candidate genes used in the qPCR of femoral articular cartilage of broilers.

<b>Gene</b>	<b>Gene/Ensembl ID</b>	<b>Primer Sequences (5'-3')</b>
<b>AVBD1</b>	ENSGALG00000022815	F: CAGGATCCTCCCAGGCTCTA R: GATGAGAGTGAGGGAAGGGC
<b>AVBD2</b>	ENSGALG00000016669	F: TTCTCCAGGGTTGTCTTCGC R: TGCATTCCAAGGCCATTTGC
<b>FBN2</b>	ENSGALG00000014686	F: TGCATCGATAGCCTGAAGGG R: CTAATTCACACCGCTCACATGG
<b>ANK1</b>	ENSG00000029534	F: CCACCATCCCACCATTCACT R: ACGGTCACAACTCCAGCAT
<b>Col28A1</b>	ENSGALG00000010259	F: ACCAGGTCTAAAGGGTCAACG R: TGGATTCCCAGAGTCTCCCA
<b>EPX</b>	ENSGALG00000043254	F: AAAGGAGGTGGCATTGACCC R: GCCACGCTGCATGTTAAGAG
<b>ADA</b>	ENSGALG00000004170	F: TTCGGCAAGAAAAGAGGGGT R: GTGTTTGGTAGCTGACGTGC
<b>COL13A1</b>	ENSGALG00000004286	F: CCAAGCAAGGACTAGACACTCA R: ACCCTTCATGCCATGTCTTCC
<b>RHAG</b>	ENSGALG00000016684	F: TCTGGAGATCACGGCCTTTG R: GCTCCAATATCTGTGGCCTGA
<b>COL8A1*</b>	NM_001293134.1	F: ACTCTCCTATTAAGCTGAGGGAC R: CAGGAAAGGGCAGAAGGACA
<b>IFI6*</b>	NM_001001296.5	F: AGAAATGGGTGCCAAAGGCT R: GAACTCCGCCTCCGCAAG
<b>OPG**</b>	ENSGALG00000016114	F: ACGCTTGTGCTCTTGGACAT R: CAGCGTAGTACTGGTCTGGG
<b>COL14A1*</b>	NM_205334.1	F: GTGATGTTGGAGCTCCTGGT R: CACACTTGACGAGCAACAGC
<b>DPT</b>	ENSGALG00000019229	F:GCCAATGTATACCGGGGGTT R: CCATTCAGTTCCTGCCCTGT
<b>ANGPTL5*</b>	NM_001197236.1	F: TCAGGAAACGCAGGTGATGC R: AGTGACACTGGCCTACATC
<b>ANGPTL7*</b>	XM_004947467.1	F: AGCTACCGTCTGTTTGTGGG R: ACCAATATCCACCTTTGCGG

\*(Petry et al., 2018) , \*\*(Paludo et al., 2017)

**Appendix A2.** Bone integrity-related traits of normal broilers and those with lameness at 21 days of age.

Trait	Femur	
	Normal	Lameness
Weight (g)	3.34 ± 0.49 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.76 <sup>b</sup>
Length (cm)	5.07 ± 0.19	4.72 ± 0.47
Thickness (cm)	0.64 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.08 <sup>b</sup>
Dry matter (%)	46.2 ± 1.44	47 ± 3.4
Ashes (%)	22.64 ± 2.27	23.08 ± 1.52
Ca (mg/kg)	74320 ± 7192	77.340 ± 6335
Mg (mg/kg)	1910 ± 195	1993 ± 176
P (mg/kg)	42270 ± 4486	43360 ± 3557
Zn (mg/kg)	115.00 ± 13.70	119.00 ± 13.10
Breaking Strength (Kgf)	28.45 ± 44.13	24.53 ± 6.60

Means followed by different letters, on the line, and within the same bone, differ from each other ( $p < 0.05$ ).

**Appendix A3.** Ontologies (biological processes, cell component and molecular functions) attributed for differentially expressed genes between normal and FHS-affected broilers

