

GUIA Gessulli

DA AVICULTURA E SUINOCULTURA INDUSTRIAL

AI | N° 08/2015 | ANO 106 | Edição 1247 | Preço único R\$ 45,00
SI | N° 05/2015 | ANO 38 | Edição 266

Gessulli
AGRICULTURE
REFERÊNCIA E INovação

agroceres

70 anos

A trajetória de um dos mais importantes grupos empresariais do agronegócio brasileiro, pioneiro no uso de inúmeras inovações tecnológicas e que se mostra já preparado para o futuro.

15 ANOS
avesui
DESDE 2002

03 a 05 de maio de 2016
Florianópolis | SC | Brasil
CentroSul

CONDRONECROSE BACTERIANA COM OSTEOMIELITE (BCO): UM PROBLEMA SUBESTIMADO NA AVICULTURA DE CORTE

A Embrapa Suínos e Aves, em uma de suas linhas de pesquisa, vem desenvolvendo estudos em genômica com foco em problemas locomotores, tanto em aves como em suínos. Em aves, a variação genética normal de características de integridade óssea e os fatores genéticos associados à BCO estão sendo investigados.

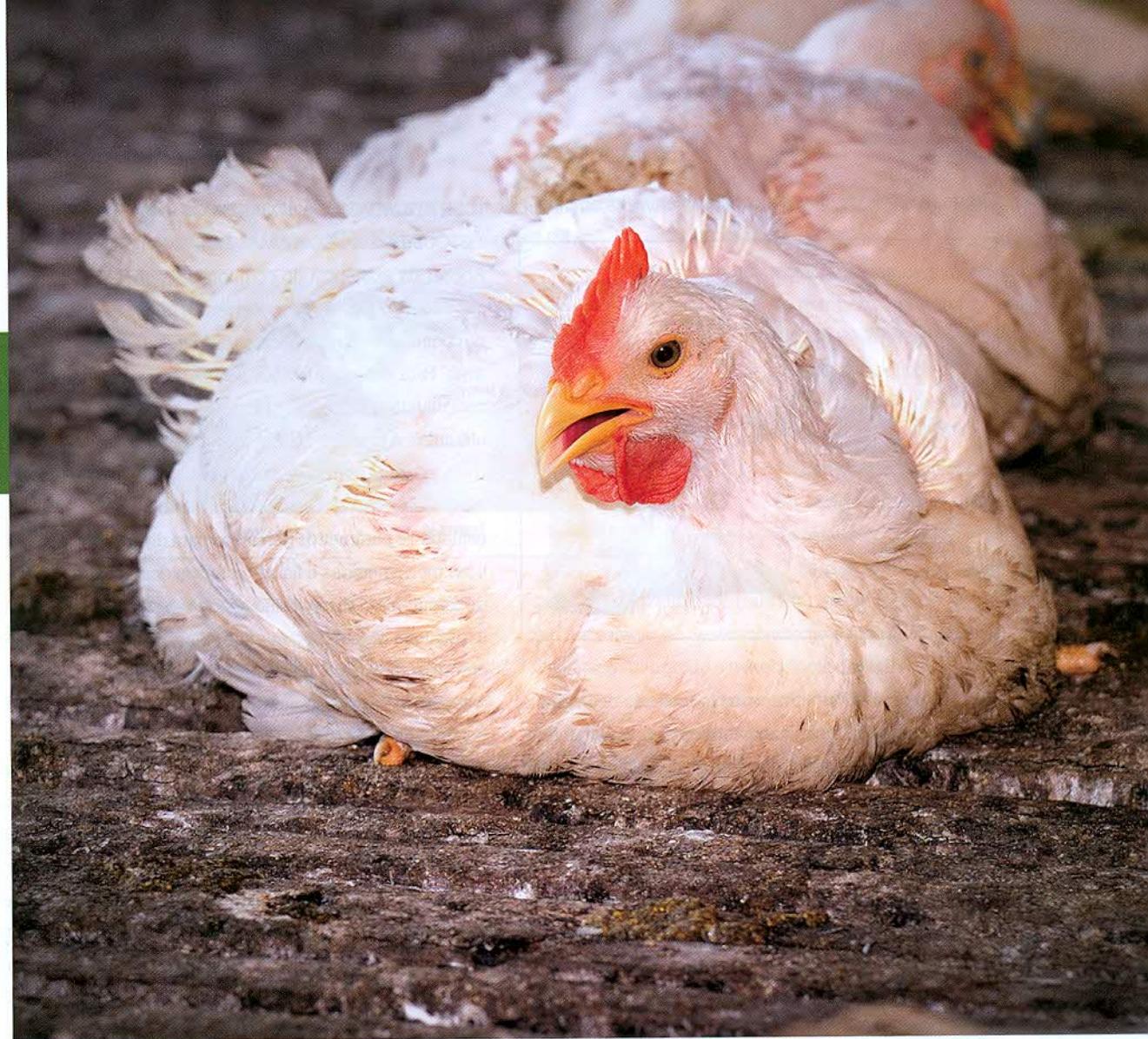
Por | Jane de Oliveira Peixoto¹, Adriana Mércia Guaratini Ibelli¹, Maurício Egídio Cantão¹, Mônica Corrêa Ledur¹

Os problemas locomotores têm causado perdas econômicas à indústria avícola por diminuir o desempenho das aves, a qualidade das carcaças e também por comprometer o bem-estar animal. As perdas diretas são devidas a descartes, lesões e condenações de carcaças em abatedouros. Contudo, muitas das perdas econômicas não estão sendo mensuradas no sistema produtivo. As aves acometidas com anomalias ósseas apresentam queda no desempenho, pois estas apresentam maior dificuldade em chegar ao comedouro e bebedouro, tornando-se frágeis e mais leves. Além disso, essas aves ficam a maior parte do tempo sentadas sobre as articulações (Figura 01), predispondo ao desenvolvimento de calos de peito, feridas nos pés e dermatites de contato. Esse maior contato dos frangos na cama favorece a interação com os micro-organismos presentes nesse ambiente contaminado.

Desde 1930, inúmeras causas de deformidades no tecido ósseo em aves vêm sendo identificadas. Deficiências ou imbalanços nutricionais, fatores genéticos, patógenos, micotoxinas e práticas de manejo afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento normal do tecido ósseo. Acredita-se que um dos fatores que contribuíram para o aumento da incidência de problemas locomotores foi o intenso processo de seleção para eficiência produtiva. O

melhoramento genético levou a obtenção de linhagens de rápido crescimento, cada vez mais precoces e com maior desenvolvimento muscular quando comparado com as outras espécies animais. Entretanto, o desenvolvimento do tecido ósseo não tem acompanhado estes processos fisiológicos, aumentando assim a incidência de problemas de pernas e fragilidade do esqueleto.

De acordo com Gonzales e Macari (2000), o melhoramento genético acelerou a taxa de crescimento, afetando a composição mineral dos ossos e cartilagens, favorecendo o aparecimento de alterações locomotoras. Além disso, a manutenção da elevada composição proteica da carcaça requer mais energia e oxigênio do que a manutenção de outros tecidos, logo, é inevitável que aves de crescimento mais rápido sejam em geral mais suscetíveis a processos que determinam hipoxia tecidual. Diante do exposto, as empresas de genética estão realizando grandes esforços para reduzir a incidência desses problemas. A robustez das pernas é um importante critério de seleção, de modo que todos os animais com sinais clínicos de deformação das pernas são eliminados. Além disso, o Raio X é utilizado para detectar as doenças de pernas com sinais subclínicos. Também é realizada seleção para capacidade cardiorrespiratória por meio de oximetria, que mede o nível de saturação de oxigênio nas hemácias, visando reduzir problemas me-



tabólicos causados pela hipoxia tecidual. Contudo, apesar dos esforços realizados, os ganhos genéticos obtidos ainda são insuficientes e os problemas locomotores persistem nas diversas linhagens, tanto de corte como de postura. Dentre as diversas patologias que afetam o tecido ósseo e a locomoção das aves, uma das condições mais prevalentes é a condronecrose bacteriana com osteomielite (BCO, do inglês: *Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis*), anteriormente conhecida como necrose da cabeça do fêmur. De acordo com Robert Wideman, a BCO é caracterizada por sítios de elevado estresse, como as regiões da cabeça do fêmur e da cabeça da tibia e também a região das vértebras sujeitas a elevado torque. Diversos organismos oportunistas têm sido isolados nas lesões de BCO, sendo os mais comuns: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., e *Streptococcal* spp. Acredita-se que as bactérias entrem na corrente sanguínea por meio de translocação através

das barreiras epiteliais intestinais ou respiratórias e podem desencadear a BCO. Apesar de sua etiologia não estar totalmente elucidada, fatores como genética, manejo, idade, o rápido crescimento e alimentação já foram relacionados com a susceptibilidade a essa condição. É possível ainda que a interrupção mecânica do fluxo sanguíneo do osso subcondral contribua para esta patologia, sendo o rápido crescimento um dos possíveis fatores que iniciam esses eventos em frangos de corte. Além disso, a patogênese da BCO tem sido mais relacionada a alinhamentos irregulares de conjuntos de condrócitos na placa de crescimento proximal do que a fraturas ou falhas corticais do osso. Entretanto, os mecanismos genéticos relacionados a essa condição ainda permanecem desconhecidos.

A BCO é uma importante causa de claudicação e estima-se que afete cerca de 1,5% dos frangos abatidos aos 42 dias idade nos Estados Unidos. No Brasil, não existem dados consistentes sobre a incidência desse problema. Fatores como estresse térmico e imunossupressão aumentam a

Figura 01. Frangos de corte com problemas locomotores



incidência de BCO e outros, como a inclusão de Vitamina D ou uso de antibióticos diminuem essa incidência. Ademais, esta é uma enfermidade muito frequente também na produção de perus. Na Figura 02 estão apresentados variados graus da manifestação desse problema em frangos de corte.

A Embrapa Suínos e Aves, em uma de suas linhas de pesquisa, vem desenvolvendo estudos em genômica com foco em problemas locomotores, tanto em aves como em suínos. Em aves, a variação genética normal de características de integridade óssea e os fatores genéticos associados à BCO estão sendo investigados, enquanto em suínos, estuda-se a osteocondrose. Para isso, as novas metodologias genômicas, como estudos de associação global do genoma (GWAS), sequenciamento do RNA (RNA-Seq) e metagenómica, são aplicadas de forma integrada com metodologias pontuais como PCR em Tempo Real. A perspectiva é avançar no estudo desses importantes problemas da produção e espera-se grande impacto no avanço do conhecimento do genoma da galinha e de vias metabólicas envolvidas nos problemas locomotores.

IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS A PROBLEMAS LOCOMOTORES

Apesar da existência do componente genético, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos genéticos envolvidos no controle de características relacionadas ao esqueleto das aves. Para entender melhor o metabolismo ósseo e suas anormalidades, duas abordagens genômicas vêm sendo utilizadas. A primeira delas é o estudo das variáveis associadas à variação normal de características relacionadas com integridade óssea. Dessa forma, estão sendo realizados estudos de parâmetros genéticos para diversas características morfométricas e físico-químicas dos ossos da tibia e do fêmur. Além disso, estão sendo realizadas análises de associação global do genoma visando identificar regiões cromossômicas e os possíveis genes que controlam essas características. A segunda abordagem é o estudo caso/controle da BCO, que é uma das patologias ósseas mais importantes em frangos de corte. Para isso, estão sendo realizados simultaneamente estudos de RNA-Seq e do metagenoma presente nas lesões da placa de crescimento do fêmur de frangos de corte. Além disso, estudos pontuais de expressão gênica vêm sendo conduzidos, nos quais alguns genes que apresentam função importante no metabolismo ósseo (genes candidatos funcionais) vêm sendo investigados. Um breve relato dos estudos em andamento está apresentado a seguir:

1) Análise de parâmetros genéticos de características relacionadas à integridade óssea

As características relacionadas à integridade óssea foram avaliadas em 1.400 aves de uma linhagem pura paterna de frangos de corte denominada TT, desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves. Esta vem sendo selecionada para múltiplas características desde 1992. Foram avaliadas 34 características de integridade óssea, medidas na tibia e no fêmur, dentre elas: peso, comprimento, espessura, teores

Figura 02. Níveis de BCO em frangos de corte

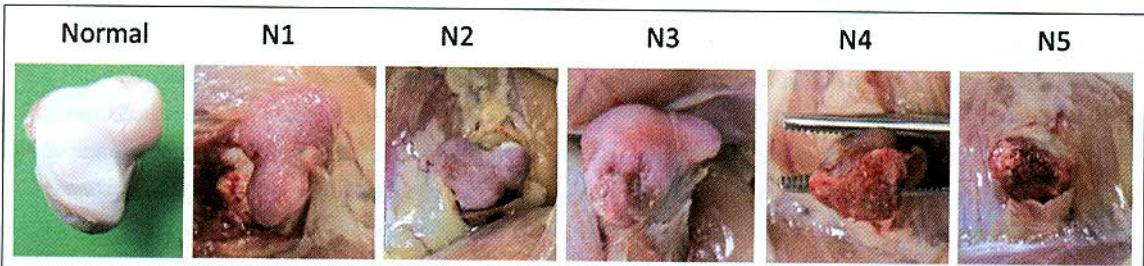
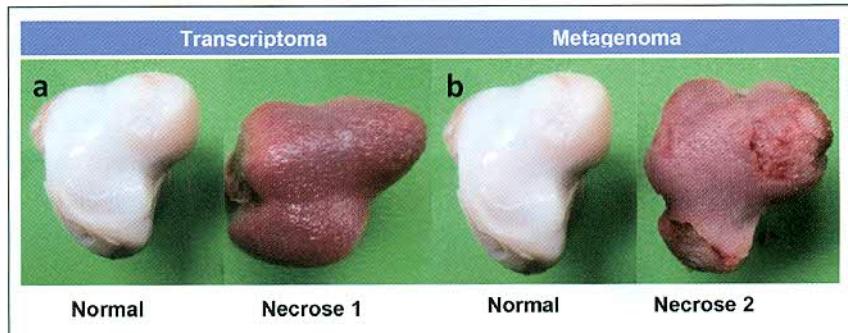


Figura 03. Amostras da cabeça do fêmur de aves normais e com distintos graus de BCO utilizadas nas análises de transcriptoma (a) e metagenoma (b)



de matéria seca, cinzas, cálcio, fósforo, magnésio e zinco, além da força de quebra, flexibilidade do osso, relação Ca:P e índice de *seedor*, que serve como indicativo da densidade óssea. De acordo com os resultados, observou-se considerável variabilidade genética para todas as características avaliadas. Dessa forma, as características de integridade óssea analisadas podem responder à seleção em função das magnitudes das estimativas de herdabilidade obtidas, que variaram de 0,18 a 0,43. Num estudo de correlação genética, observou-se que a seleção para peso aos 42 dias aumenta a força de quebra e, em menor proporção, a flexibilidade do osso. Contudo, a flexibilidade parece ser um parâmetro mais adequado para melhorar a integridade óssea, devido a sua correlação positiva com relação Ca:P e também ao fato desse parâmetro incluir componentes orgânicos do osso, como o colágeno. A maior flexibilidade do osso proporciona maior tolerância das aves aos estresses da produção intensiva.

2) GWAS para características de integridade óssea

Estudos de associação global do genoma estão sendo realizados visando identificar marcadores genéticos e genes associados à variação normal das características de integridade óssea. Para isso, o painel de 600 mil marcadores da Affymetrix foi utilizado para a genotipagem das 1.400 aves da linhagem TT, nas quais foram avaliadas as 34 características de integridade óssea mencionadas acima. A genotipagem foi realizada em parceira com a Esalq-USP no Laboratório Multusuário Centralizado de Genômica Funcional Aplicada a Agropecuária e Bioenergia, coordenado pelo Prof. Dr Luiz L. Coutinho. Esses estudos, em andamento, estão sendo utilizados para o desenvolvimento de uma dissertação de mestrado na Unesp de Jaboticabal e duas teses de doutorado na Esalq-USP. Além do auxílio na formação de recursos humanos na área de genômica, esses resultados irão contribuir

para o avanço do conhecimento do controle genético das características de integridade óssea, permitindo também o estudo de interações gênicas e rotas metabólicas envolvidas no metabolismo ósseo.

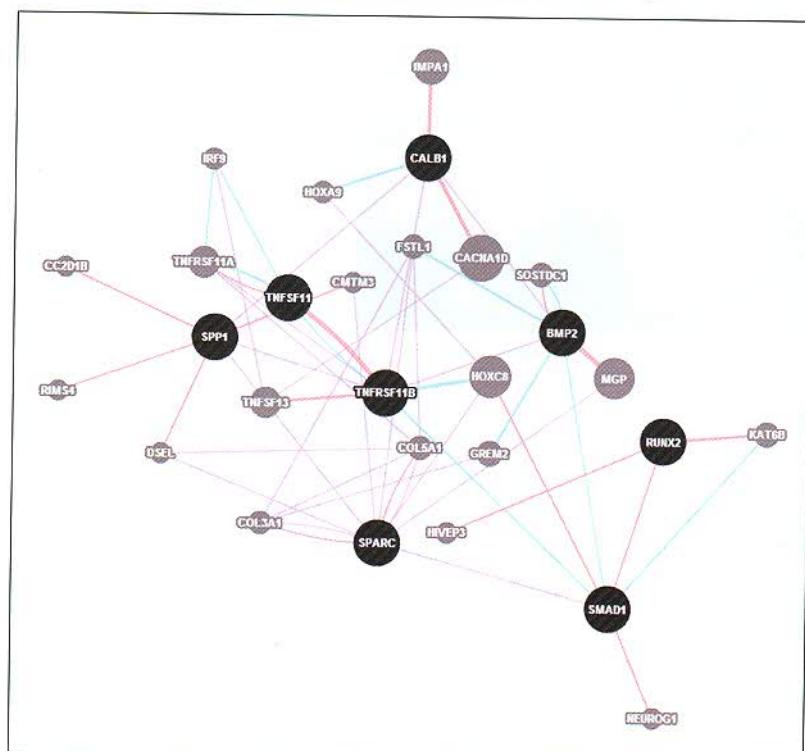
3) Estudo do transcriptoma do tecido ósseo da cabeça do fêmur

O transcriptoma é o conjunto

completo de transcritos (mRNAs) em uma célula ou tecido em um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica. Utilizando a metodologia de RNA-Seq é possível identificar variações na expressão gênica sem a necessidade de dados de sequências preliminares. Desta maneira, é possível descobrir quais genes apresentam expressão alterada devido à manifestação da BCO e também entender como o tecido ósseo das aves reage a essa condição fisiológica. Nos estudos do transcriptoma foram utilizados machos de uma linhagem comercial de frangos de corte aos 35 dias de idade. Foram utilizados quatro animais normais e quatro animais afetados com BCO no estágio inicial (Figura 03a, *status necrose 1*) que foram sequenciados na plataforma Illumina. O transcriptoma do tecido ósseo da placa de crescimento do fêmur de frangos de corte foi mapeado usando como referência o genoma da galinha. Como resultado, cerca de 15 milhões de sequências foram geradas por amostra. Dos 17.108 genes já descritos no genoma da galinha, um total de 11.500 genes foi expresso na placa de crescimento do fêmur. Por meio de análises estatísticas, um conjunto de 153 genes diferencialmente expressos entre frangos normais e afetados foram detectados.

A partir da identificação dos genes diferencialmente expressos entre as duas condições avaliadas neste experimento, várias vias metabólicas foram exploradas, destacando-se as de genes relacionados à matriz orgânica e regiões extracelulares. Agrupam-se nestas vias genes da família dos colágenos, das angiopoietinas-like, das BMPs (proteínas relacionadas à formação do osso), condroaderinas, entre outros. Foi possível observar que as funções desses genes estão diretamente ligadas à formação e desenvolvimento ósseo e de cartilagens e também relacionadas à vascularização tecidual. Esses três processos são de fundamental importância para a qualidade do esqueleto. Alterações na

Figura 04. Redes metabólicas dos genes estudados e suas interações



expressão de genes responsáveis pela vascularização tecidual causam supressão na vascularização sanguínea do tecido ósseo, predispondo à necrose da cabeça do fêmur. Também foram identificados polimorfismos entre as sequências dos transcritos do grupo controle e do grupo afetado. Estes deverão ser investigados, pois são potenciais marcadores moleculares para uso em seleção.

No entanto, ainda são necessários mais estudos visando o melhor entendimento da atuação desses genes ao longo do desenvolvimento das aves. Dessa forma, será possível observar se a alteração na expressão desses genes ocorre desde o nascimento das aves ou se decorre de seu rápido crescimento. Além disso, foi possível verificar, tanto considerando as características físico-químicas, quanto as de expressão gênica, que o depósito de minerais nos ossos parece não participar diretamente na manifestação da BCO. O entendimento dos fatores genéticos associados à formação e manutenção da matriz óssea pode levar a compreensão de como os fatores nutricionais, ambientais e de manejo afetam o processo de necrose. Assim, será possível elaborar estratégias para diminuir a prevalência dessa patologia na avicultura de corte. A partir do transcriptoma gerado, mais de 90% dos genes foram menos expressos no grupo afetado com BCO quando comparado ao grupo normal, indicando

terações que níveis baixos de RNA mensageiro de genes essenciais na formação da matriz orgânica do osso podem estar associados a essa condição. Dessa forma, foi possível avançar no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo ósseo da galinha e identificar genes candidatos associados a problemas locomotores em frangos de corte.

4) Estudos de PCR em tempo real de genes candidatos funcionais

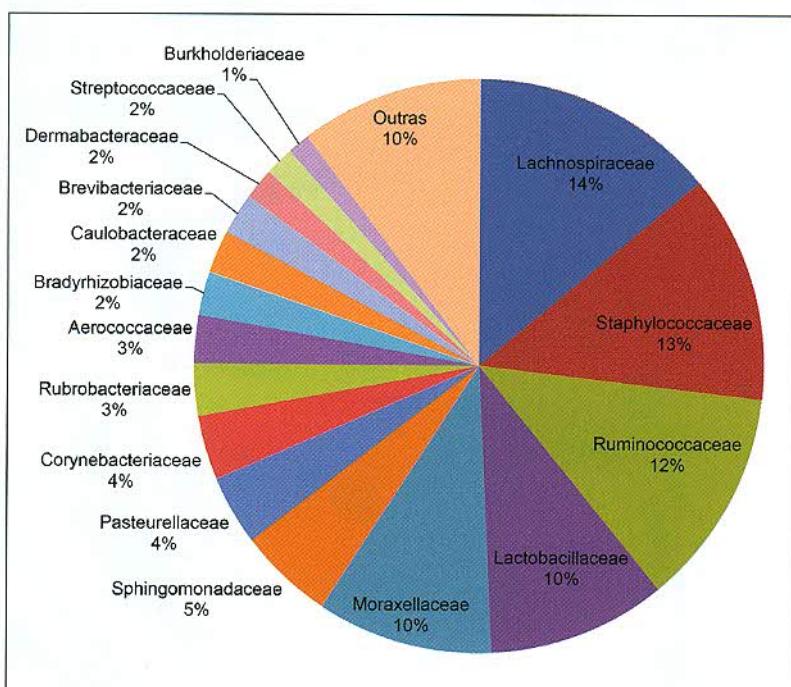
Além dos estudos globais do genoma e transcriptoma, estão sendo realizados estudos de expressão de genes específicos, os quais sabidamente estão envolvidos com o metabolismo ósseo em condições normais. Estes genes participam de diversas vias metabólicas e podem interagir entre si, regulando a expressão gênica no

tecido ósseo (Figura 04). A expressão dos seguintes genes foi quantificada em animais normais e afetados com BCO: *SPPI*, *TNFRSF11B*, *SPARC*, *CALBI*, *CALM*, *IBSP*, *COL1A2*, *BMP2*, *RANKL*, *Smad1* e *Runx2*. Os genes *RUNX2* e *SPARC* se apresentaram diferencialmente expressos entre as aves normais e com problemas. Observou-se que no grupo afetado esses genes apresentam-se quatro vezes menos expressos ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle. Em relação ao gene *RUNX2*, este é fundamental para a diferenciação dos osteoblastos, além de estimular o VEGF, que é o gene responsável por alimentar a invasão de vasos sanguíneos na placa de crescimento do fêmur. Dessa forma, esses resultados indicam que em frangos de corte comerciais a regulação negativa do gene *RUNX2* pode contribuir para a incidência da BCO.

5) Estudo da microbiota presente no tecido ósseo da cabeça do fêmur

O metagenoma pode ser considerado o conjunto de genomas da microbiota total de um determinado habitat. A partir da evolução das técnicas de sequenciamento, tem sido possível realizar a análise genômica das comunidades de micro-organismos diretamente em seus habitats, por técnicas independentes de cultivo. Esta é uma das vantagens da análise de metagenomas, pois a grande maioria dos micro-

Figura 05. Principais famílias de bactérias encontradas na região da placa de crescimento do fêmur de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade



-organismos não é cultivável. Diversos micro-organismos já foram isolados nas lesões de BCO, por meio de cultivo, porém é interessante analisar a microbiota existente de forma global e independente do cultivo. Dessa forma, objetivou-se identificar os grupos de bactérias presentes na cabeça do fêmur de frangos de corte comerciais normais e afetados com BCO. Para isso, amostras de DNA de nove machos nas idades de 21 e 42 dias (Figura 03b, status necrose 2) foram submetidas ao sequenciamento das regiões V3-V4 do gene do RNA ribossômico 16S usando a plataforma Illumina-MiSeq. Por meio de análises de bioinformática, identificou-se a diversidade bacteriana e as principais famílias de micro-organismos encontradas na região da placa de crescimento do fêmur, tanto de aves normais como de afetadas (Figura 05). As principais famílias de bactérias encontradas foram: *Lachnospiraceae* (14%), *Staphylococcaceae* (13%), *Ruminococcaceae* (12%), *Lactobacillaceae* (10%), *Moraxellaceae* (10%), *Sphingomonadaceae* (5%), entre outras. Foi possível observar considerável diversidade bacteriana, tanto em animais normais quanto nos afetados com BCO. Quando a análise foi direcionada para o gênero dessas bactérias, e os grupos de aves normais e afetadas foram comparados, observou-se que os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Dietzia* spp. foram os mais abundantes nos animais afetados. Estes dois gêneros são classificados

como oportunistas na manifestação de diversas doenças em várias espécies, sendo que o gênero *Staphylococcus* vem sendo amplamente isolado em lesões decorrentes de BCO. Contudo, novos estudos com maior amostragem e cobertura de sequenciamento deverão ser realizados para aprofundar essa análise em nível de espécie. A classificação das espécies de bactérias presentes nas lesões permitirá o entendimento da dinâmica destas populações na manifestação da BCO.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a integração dos resultados obtidos utilizando-se modernas tecnologias, como GWAS, RNA-Seq, metagenômica e metodologias pontuais, como PCR em tempo real, está sendo possível avançar na etiologia e

descoberta dos fatores predisponentes a BCO. Esse conhecimento poderá ser utilizado de forma integrada com outras áreas da produção para traçar estratégias visando diminuir a incidência desses problemas na cadeia produtiva de aves. As perspectivas desses estudos na Embrapa Suínos e Aves são de continuar avançando no conhecimento sobre os mecanismos genéticos responsáveis pela manifestação da BCO. Além disso, pretende-se fortalecer a parceria com empresas públicas e privadas para a realização de pesquisas relacionadas a problemas locomotores envolvendo diversas áreas da produção. Sobretudo, busca-se despertar o interesse do setor produtivo para a necessidade de se quantificar o real impacto econômico desses problemas na produção. A mensuração mais acurada das perdas causadas pelos problemas locomotores impulsionará a busca prioritária de soluções para redução desses graves problemas na avicultura, refletindo também na melhoria do bem-estar das aves. ■

Embrapa Suínos e Aves

*A Literatura Citada nesse artigo pode ser obtida no site da Avicultura Industrial por meio do link:
www.aviculturaindustrial.com.br/?condronecrose0815*