

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS JABOTICABAL

PARÂMETROS GENÉTICOS PARA INTEGRIDADE ÓSSEA
DO FÊMUR E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES
***RUNX2* E *TNFSF11* EM FRANGOS DE CORTE**

Natalia Vinhal Grupioni
Zootecnista

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS JABOTICABAL

PARÂMETROS GENÉTICOS PARA INTEGRIDADE ÓSSEA
DO FÊMUR E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES
***RUNX2* E *TNFSF11* EM FRANGOS DE CORTE**

Natalia Vinhal Grupioni

Orientador: Prof. Dr. Danísio Prado Munari

Coorientadoras: Dra. Mônica Correa Ledur

Dra. Jane de Oliveira Peixoto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal.

2015

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AO DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO DE CARÇAÇA. ÓRGÃOS E INTEGRIDADE ÓSSEA DO FÊMUR E SUAS ASSOCIAÇÕES COM OS GENES RUNX2 E TNFSF11 EM FRANGOS DE CORTE

AUTORA: NATALIA VINHAL GRUPIONI

ORIENTADOR: Prof. Dr. DANÍSIO PRADO MUNARI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JANE DE OLIVEIRA PEIXOTO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MÔNICA CORRÊA LEDUR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL , pela Comissão Examinadora:



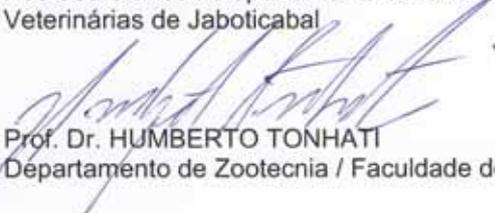
Prof. Dr. DANÍSIO PRADO MUNARI

Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

Pós-doutoranda / Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



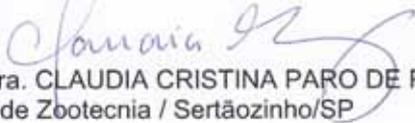
Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. ADRIANA MERCIA GUARATINI IBELLI

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Concórdia/SC



Profa. Dra. CLAUDIA CRISTINA PARO DE PAZ

Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Data da realização: 26 de fevereiro de 2015.

G892p Grupioni, Natalia Vinhal
Parâmetros genéticos para integridade óssea do fêmur e estudo da associação dos genes *RUNX2* e *TNFSF11* em frangos de corte. / Natalia Vinhal Grupioni. -- Jaboticabal, 2015
xvii, 60 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Danísio Prado Munari
Coorientador: Mônica Correa Ledur, Jane de Oliveira Peixoto
Banca examinadora: Nedenia Bonvino Stafuzza, Humberto Tonhati, Claudia Cristina Paro de Paz, Adriana Mércia Guaratini Ibelli
Bibliografia

1. Correlação genética. 2. Genes candidatos. 3. Herdabilidade. 4. Minerais. 5. Seleção assistida por marcadores. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
E-mail: natalia.grupioni@yahoo.com.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NATALIA VINHAL GRUPIONI – nascida em 28 de novembro de 1986, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, filha de José Antônio Romero Grupioni e Fátima Maria Vinhal Grupioni. Iniciou o curso de Zootecnia na Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP em março de 2005 e obteve o título de Zootecnista em janeiro de 2010. Recebeu o “PRÊMIO ZOOTEKNIA” atribuído pela Coordenadoria de Trabalhos de Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, ao melhor Trabalho de Iniciação Científica para Graduação em Zootecnia, com apoio da FAPESP. Em março de 2010, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Danísio Prado Munari, com o apoio da FAPESP. Em fevereiro de 2012, tornou-se Mestre em Genética e Melhoramento Animal. Em março de 2012, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento Animal, pela Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Danísio Prado Munari com o apoio da CAPES. Em novembro de 2013, realizou estágio de Doutorado sanduíche na *University of Missouri*, Columbia, MO, Estados Unidos, sob orientação do Dr. Jerry Taylor com o apoio da CAPES.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Dedico

***Aos meus amados Pais José Antonio e Fátima,
As minhas irmãs Priscila e Carolina,
Ao meu Tio Mira,
Pelo amor incondicional.***

Agradecimentos

Ao **Senhor meu Deus**, obrigada por fazer de mim instrumento de sua vontade. Agradeço ao Senhor por todos os dias bons e ruins e por todas as vezes que me carregou no colo nesta jornada. Obrigada meu Deus por guiar meus passos.

Aos meu queridos e amados Pais, **José Antonio Romero Grupioni e Fátima Maria Vinhal Grupioni** obrigada por todo amor, carinho e paciência que sempre tiveram comigo. Obrigada por me apoiarem em todas minhas escolhas e me incentivarem à ser uma pessoa cada vez melhor. Vocês me deram a sabedoria da vida e todos ensinamentos que um ser humano deveria ter. São estes valores morais que carrego sempre comigo. Minha gratidão será eterna. Obrigada minha **Família**, por viverem este sonho comigo. Esta conquista é nossa!

As minhas irmãs **Priscila Vinhal Grupioni e Carolina Vinhal Grupioni**, meus tesouros. Obrigada por serem essas irmãs tão presentes, amigas e companheiras que vocês são. Obrigada por serem os pilares de minha vida. Tenho muito orgulho de vocês.

As **minhas cachorrinhas** Catarina, Nina Maria, Belinha, Júlia, Melzinha e Bruna (*in memoriam*), pela fidelidade em esperar por meu retorno todos os finais de semana. Vocês sempre me deram muito amor e muita alegria.

Ao meu Tio **Carlos Mirabeau de Moraes**, meu segundo Pai, meu filho, meu amigo. Obrigada por fazer parte de nossa família e cuidar de mim com tanto zelo e atenção.

Aos meus cunhados e irmãos, **Frederico Macedo da Rocha e Hilário Alves da Silva**, obrigada por fazerem parte de minha família e serem estes homens tão bons, educados, gentis, cavalheiros, e exemplos de pessoas dignas. Sou muito feliz em ter vocês como meus amigos e irmãos. Obrigada por fazerem minhas irmãs duas mulheres tão felizes.

Ao meu namorado e companheiro **Jander Moreira Monteiro**, obrigada por acreditar em meus sonhos e fazer deles, nossos sonhos.

Aos que nos deixaram muito cedo, porém estarão sempre presentes em meu coração, **Vô João Luiz Vinhal, Vó Maria Cândida de Jesus e Tia Sandra Senise** (*in memoriam*). É muito difícil não pensar em vocês e não sentir saudades. Eu gostaria que vocês estivessem aqui para comemorar esse título tão sonhado e esperado, mas Deus chamou vocês para perto. Sinto a presença constante de vocês em minha vida e sei que estão olhando e guardando meus caminhos. Saudades eternas.

Aos **amigos da vida**: Tio Oswaldo Senise, minha querida e amada amiga Thaís Borges Lessa, minha companheira de apartamento e amiga Natalia Aguilar, Itamar Alves da Silva, Rita Lima, Hermínio Ângelo, Guilherme Fazan Rossi, Vânia Júdice. Milena Moreira Monteiro, Kyoto Ogassahara, Arivaldo Monteiro, Bruna Senise, Livia Senise, Gabi Scanduzzi, Paulo Oliveira, Victor Sala, Nilza, Edna, Edson.

Às famílias **Vinhal** e **Grupioni**, pelo suporte e amor sempre dados. Em especial à Tia Dulce, Tio Sérgio, Fernanda Sakamoto, Tia Cida, Tio Lino, Tia Dinorá, Tia Tunica, Tio Mané, Carla Santos, Tia Lázara, Tio Lioz, Carmem dos Santos, Tia Luiza, Tio Anízio, Jefferson Vinhal, Milene Vinhal, Jéssica Vinhal.

Ao meu orientador, amigo e mestre **Prof. Dr. Danísio Prado Munari**, agradeço por todos estes anos de amizade e aprendizado. Já são quase 10 anos trabalhando juntos e só tenho à lхе agradecer pela excelente formação acadêmica que me proporcionou e acima de tudo, formação pessoal. Estendo meus agradecimentos à sua esposa **Rosemeire Vasconcelos** pelo carinho e amizade acima de tudo, e por todos chás da tarde e jantares que me proporcionou em momentos de desespero nos prazos finais. Obrigada por tamanho cuidado e zelo.

Aos **membros da banca de qualificação**, Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza, Prof. Dr. Danísio Prado Munari, Dr. Salvador Boccaletti Ramos, Dr. Rodrigo Pelicioni Savegnago e Dr. Guilherme da Costa Venturini agradeço por colaborarem

minuciosamente para a execução de um excelente trabalho. Obrigada pela amizade de todos.

Aos **membros da banca de defesa de tese**, Dr. Danísio Prado Munari, Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza, Dra. Cláudia Cristina Paro de Paz, Dra. Adriana Mércia Guaratini Ibelli, Prof. Dr. Humberto Tonhati, por toda atenção e sugestões atribuídas para a melhoria deste trabalho.

Aos **amigos e professores do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP**, Profa. Amanda Peticarrari, Prof. Antônio Sérgio Ferraudó, Prof. Dilermando, Prof. João Ademir de Oliveira, Profa. Andréia, Prof. Newton, Prof. Glauco, Prof. Barbosa, Prof. Euclides, Prof. Adhemar, Prof. Gener, Prof. Peruzzi, obrigada pelos ensinamentos profissionais e pessoais, e pelos anos de amizade. Nosso departamento é nossa casa.

Aos **amigos e funcionários do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP**, minha querida amiga Adriana Takakura e seu bebê já muito amado, Sirley, Zezé, Juliana, Norival, Kyoto. Obrigada pelo carinho e amizade cultivados diariamente pelo amor de vocês. Vocês são pessoas muito queridas. Shirley e seu cafézinho, sentirei saudades!

Aos **amigos e colegas de trabalho do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP**, Nedenia Bonvino Stafuzza, Luara Afonso, Valdecy Cruz, Rodrigo Savegnago, Tássia Bertipaglia, Fábio José Gomes, Salvador Ramos, Mirelle Picinato, Maísa Nakagawa, Marcos Buzanksas, Guilherme Nascimento, Priscila Arrigucci, Jaqueline Rosa, Thiago Bruno, Tatiane Chud, Leonardo Seno, Jorge Petroli, Ana Paula Sbardella, Letícia Joaquim, obrigada pela amizade e companheirismo construído todos estes anos. Estendo meus agradecimentos em especial à Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza pela amizade e pelas valiosas contribuições técnicas para o enriquecimento da qualidade deste trabalho. Muito obrigada.

Aos **funcionários da FCAV/UNESP: Professores e mestres da vida**: Prof. Murácy Bélo, Profa. Rosemeire Vasconcelos, Profa. Sandra Aidar de Queiroz,

Profa. Vera Hossepian, Profa. Maria Célia Portela, Prof. Roberto Carvalheiro; **da Pós-graduação:** Fernanda Raymundo, Branca, Gibson, Diego Mafra, Edna, Márcia, Gabriela, Moisés, Nina; **da Graduação da FCAV/UNESP:** Mônica D'amico Chioda; **das atividades auxiliares:** Rodrigo, Tina; **da Zeladoria:** João, Paulo; **da Engenharia Rural:** Sebastião Silva; **da biblioteca:** Tieko, Adriana, Marta, Mabel, Nely, Karina, Núbia; **do protocolo:** Antonio; **da seção de materiais:** Janaína, Bianca; **do almoxarifado:** Marcela; **da Vice-Diretoria:** Fieno, Prof. Dr. Marcílio; **do audiovisual:** Wilson, Aduino; **da avicultura:** Vicente.

As minhas **Coorientadoras Dra. Mônica Correa Ledur e Jane de Oliveira Peixoto**, obrigada pela oportunidade concedida de trabalhar com os dados da EMBRAPA e pela co-orientação deste trabalho. Jane, obrigada pelo acolhimento em sua casa, pelas pescarias e companhia durante minha estadia em Concórdia. Não tenho como te agradecer por tudo.

À **EMBRAPA Suínos e Aves**, pela parceria, uso de infraestrutura e dados concedidos para realização deste trabalho.

Aos **amigos da EMBRAPA Suínos e Aves**, Ricardo Zanella, Maurício Cantão, Adriana ibelli, Karina Neis, Bruna Petry, Ediane, Vicky Lilge Kawski, José Rodrigo Pandolfi, Edilena Paris.

Friends from Animal Science Department – University of Missouri: Dr. Jerry Taylor, Dr. Jae Woo Kim, Dr. Bob Schnabel, Dr. Jared Decker, Dr. Duane Keisler, Dr. David Ledoux, Dr. David Patterson, Dr. Mike Smith, Dr. Kevin Wells, , Jesse Hoff, Miranda Wilson, Holly Ramey, Maria Therese, Lynsey Whitacre, Cinda Hudlow, Karen Abercrombie. Thank you everybody, I really appreciate your support and the science that I learned with you guys, in specially Helen Yampara one of my best friend and the better person in the whole world.

Friends from Columbia, Missouri, EUA: Tina Brantly, Alex, Adrian, Ramón, Lorraine Mc Ginn, Elizabeth Smith, Ashton Jarret (Campus Lodge), Carly Tubridy (Campus Lodge), Mallory Hecht (Campus Lodge), Internation Community Church, (ICC), Teacher Penny; **Friends from world:** Brian Sayre (Virginia, USA), Bengi

Çinar Kul, (Ankara, Turley), Mostafa Nassar (Cairo), Hussain Bahbahani (Kuwait), Marina Duran (Mexico). Thanks all for supporting me and your friendship!

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP**, Campus de Jaboticabal, pela excelente formação pessoal e profissional que me foi concebida e por todos os momentos inesquecíveis desfrutados neste Campus.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduíche para a concretização deste trabalho.

Enfim, Dra. Natalia Vinhal Grupioni.

“O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos (Paulo Coelho).”

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.2.1 Panorama da avicultura brasileira no cenário mundial.....	3
1.3.2 Composição do tecido ósseo	3
1.3.3 Integridade óssea em galinhas.....	4
1.3.4 Genoma da galinha (<i>Gallus gallus</i>)	6
1.3.5 Loci de características quantitativas (QTL)	7
1.3.6 Genes candidatos analisados	7
1.3.7 Contribuição dos estudos relacionados à integridade óssea para avicultura de corte.....	9
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 2. ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS, FENOTÍPICOS E AMBIENTAIS PARA CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À INTEGRIDADE ÓSSEA DO FÊMUR E PESO AOS 42 DIAS DE IDADE EM UMA POPULAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	15
2.1 INTRODUÇÃO	18
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1 População experimental e colheita dos dados	19
2.2.2 Características fenotípicas	20
2.2.3 Análises estatísticas	22
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
2.4.1 Análises estatísticas	23
2.4.1.1 Estimativas de herdabilidade, correlações genéticas, fenotípicas e ambientais	23
2.5 CONCLUSÕES	32
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 3. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES <i>RUNX2</i> E <i>TNFSF11</i> COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, ORGÃOS, CARÇAÇA E INTEGRIDADE ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA DE FRANGOS DE CORTE	36
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.2.1 População e colheita dos dados fenotípicos	40
3.2.2 Análise laboratorial para obtenção dos genótipos.....	44
3.2.2.1 Extração e quantificação de DNA.....	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.4 CONCLUSÃO.....	57

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

PARÂMETROS GENÉTICOS PARA INTEGRIDADE ÓSSEA DO FÊMUR E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *RUNX2* E *TNFSF11* EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO – Em programas de melhoramento de frangos de corte, as aves são selecionadas principalmente para características de desempenho e carcaça, acarretando em mudanças no tamanho, forma e função dos órgãos, o que implica em alterações fisiológicas importantes durante o desenvolvimento das aves. A seleção intensa dos frangos de corte resultou em problemas locomotores, diminuição da resistência óssea dos animais e aumento da mortalidade. Com isso, técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas na seleção assistida por marcadores com o intuito de identificar genes candidatos para auxiliar no processo de seleção de características relacionadas às desordens ósseas. Os objetivos do presente trabalho foram estimar os parâmetros genéticos para características relacionadas à integridade óssea do fêmur e peso aos 42 dias de idade e estudar as associações dos genes *RUNX2* (“*Runt-related transcription factor 2*”) e *TNFSF11* (“*Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*”) com características de importância econômica em frangos de corte no intuito de fornecer suporte para o programa de melhoramento genético de aves e direcionar o processo de seleção visando a redução dos problemas relacionadas às desordens ósseas. Estimativas de parâmetros genéticos, fenotípicos e ambientais foram obtidas para características associadas à integridade óssea do fêmur e peso aos 42 dias de idade (P42) pelo método de máxima verossimilhança restrita utilizando modelo animal multicaracterística, com efeito fixo de grupo (sexo e incubação) e os efeitos aleatórios genéticos aditivos e residuais. Análises de associações genéticas entre o SNP g.57.397A>G (*RUNX2*) e SNP g.14.614A>G (*TNFSF11*) com características de desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea do fêmur foram realizadas com o propósito de avaliar os efeitos desses polimorfismos sobre esse grupo de características, por meio da metodologia de máxima verossimilhança. Foi utilizado o banco de dados da população referência TT com cerca de 1.500 aves de corte pertencentes ao programa de Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/SC, Brasil. Coeficientes de herdabilidade estimados para peso aos 42 dias de idade e características relacionadas à integridade óssea

do fêmur variaram entre 0,10 (0,05) e 0,50 (0,08) para rendimento de peso dos fêmures resfriados e P42, respectivamente, e indicam que as características possuem componente genético aditivo com magnitude suficiente para responder ao processo de seleção, com exceção do rendimento de peso dos fêmures resfriados, que apresentou coeficiente de herdabilidade de baixa magnitude. Coeficientes de correlações genéticas com magnitude alta e favorável entre força de quebra e rigidez do osso e características relacionadas ao teor de minerais (cálcio, fósforo, zinco, magnésio, relação cálcio: fósforo) e matéria mineral (cinzas) do fêmur indicaram que, a seleção visando resistência à força de quebra do osso do fêmur, acarretará em maiores teores de minerais e matéria mineral nos ossos. Contudo, as estimativas de correlações genéticas entre P42 e minerais indicam a importância da seleção para P42 com maior ênfase no intuito de tornar a linhagem estudada mais competitiva na cadeia produtiva de carne de frangos, dado que a mesma não acarretará em diferenças na resistência óssea dos animais. Nas análises de associação genética, foi verificada associação genética significativa ($P < 0,05$) para o SNP g.57.397A>G do *RUNX2* com características peso aos 21 dias, consumo de ração dos 35 aos 41 dias, ganho de peso dos 35 aos 41 dias, peso de sangue e penas, peso da pele do peito, peso do pulmão, rendimento de sangue e penas, rendimento de pele e carne do peito. Foram encontradas associações genéticas significativas ($P < 0,05$) entre o SNP g.14.614A>G do *TNFSF11* e peso ao nascimento, peso e rendimento do coração e associações genéticas sugestivas ($P < 0,10$) entre as características de importância econômica como gordura abdominal e seu respectivo rendimento. Deste modo, a seleção do SNP g.14.614A>G do *TNFSF11* que favoreça o alelo G será contra gordura abdominal, o que pode minimizar a deposição de gordura e melhorar a qualidade da carcaça em frangos de corte.

Palavras-chave: correlação genética, genes candidatos, herdabilidade, minerais, seleção assistida por marcadores.

GENETIC PARAMETERS FOR FEMORAL BONE INTEGRITY AND ASSOCIATION STUDY OF *RUNX2* AND *TNFSF11* GENES IN BROILERS

ABSTRACT – In the broiler breeding programs, the broilers are selected primarily for performance and carcass traits, resulting in changes in the size, shape and function of organs which implies important physiological changes during the development of the broilers. Intense selection of broilers resulted in locomotor problems, decreased bone strength of animals and increased mortality. Thus, molecular screening techniques began to be used in order to identify candidate genes to assist in the selection of related traits to bone disorders. The objective of this study was estimate genetic parameters for traits related to femoral integrity bone and weight at 42 days and association study of *RUNX2* ("Runt-related transcription factor 2") and *TNFSF11* ("Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11") genes with economical traits in broilers in order to provide support for the broiler breeding program and direct the selection process to reduce problems related to bone disorders. Estimates of genetic parameters were obtained for traits associated with the femur bone integrity and weight at 42 days of age by the restricted maximum likelihood method using multi-trait animal model with the fixed group effect (sex and incubation), and the random effects and additives residuals. The investigation of polymorphisms in association *RUNX2* genes and *TNFSF11* and the association study of polymorphisms found and their respective SNPs (Nucleotide single polymorphism) of *RUNX2* genes (SNP g.57.397A>G) and *TNFSF11* (SNP g.14.614A> g) with the performance, carcass composition, parts and femoral bone integrity in order to evaluate the effects of these polymorphisms about this group of traits to maximum likelihood method. We used the TT reference population database with about 1,500 broilers belonging to Embrapa Swine and Poultry Breeding Program in Concordia/SC, Brazil. Heritability coefficients estimated for weight at 42 days of age (W42) and the related traits to the femur bone integrity ranged from 0.10 (0.05) 0.50 (0.08) for cold femurs yield and W42, respectively, indicating that the traits have additive genetic component with sufficient magnitude to indicate that they can respond to the selection process except for cold femurs yield, which showed heritability coefficient of low magnitude. Coefficients of genetic correlations between high and favorable magnitude between breaking strength, bone stiffness and related traits to

mineral contents (calcium, phosphorus, zinc, magnesium, calcium: phosphorus relation) and mineral matter (ashes) of the femur indicated that selection for resistance to force of the femur bone breaks, will result in higher mineral content and mineral content in the bones. However, estimates of genetic correlations between W42 and minerals indicate the importance of selection for W42 with greater emphasis in order to make it more competitive lineage studied in the production chain of broilers, as it would not result in differences in bone strength of animals. In genetic association analyzes, the SNP g.57.397A>G *RUNX2* was significantly associated ($P<0.05$) with the weight at 21 days, feed conversion of 35-41 days, weight gain of 35-41 days, blood and feather weight, skin breast weight, lung weight, blood and feather yield, breast skin and breast meat yield. Genetic associations were significant ($P<0.05$) between the SNP g.14.614>G from *TNFSF11* gene and birth weight, heart weight and yield and suggestive ($P<0.010$) between economic traits such as abdominal fat and abdominal fat yield. The selection for SNP g.14.614>G (*TNFSF11*) favoring allele G will be against abdominal fat, wich can reduce abdominal fat deposition and improve carcass quality in broilers.

Keywords: candidate gene, genetic correlation, heritability, marked assisted selection, minerals.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A importação de materiais genéticos avícolas especializados na década de 60, possibilitou a produção de carne e ovos em escala industrial, e proporcionou a evolução da avicultura brasileira. Com isso, resultados positivos foram alcançados por meio de melhorias em sanidade, nutrição, ambiente, manejo e do melhoramento genético (ROSÁRIO et al., 2004). O aumento da produção de carne resultou principalmente da ação de programas de melhoramento genético animal, que permitiram à indústria avícola comercializar aves mais pesadas em menor período de tempo. Segundo Aviagen (2009), durante as últimas três décadas, o peso vivo de frangos de corte aumentou 30% e a idade de abate destes animais foi reduzida em 27%.

Avanços na taxa de crescimento das aves destinadas à produção de carne são atribuídos à seleção de características de desempenho e carcaça como o peso vivo, conversão alimentar e peso de peito. De acordo com Burt (2002), observou-se progresso na seleção com relação à produção de ovos e carne em frangos. Entretanto, modificações no tamanho, forma e função dos órgãos das aves, provocados pela intensa seleção para estas características, acarretaram em alterações fisiológicas no desenvolvimento desses animais e aumento da mortalidade (GAYA et al., 2006).

Programas de melhoramento genético animal foram implantados no Brasil, com o intuito de melhorar a eficiência produtiva das linhagens existentes no país (SCHMIDT e ÁVILA, 1990). A maximização da produção de carne com o auxílio de programas de melhoramento genético é feita por meio da seleção. A importância do estudo dos parâmetros genéticos neste trabalho se deve ao fato de que a seleção em frangos de corte é direcionada especialmente para características de desempenho e carcaça, favorecendo o aparecimento de problemas locomotores nos animais e diminuição da resistência óssea. Com isso, técnicas de seleção passaram

a ser empregadas no intuito de selecionar animais que possuam menos propensão ao desenvolvimento de desordens ósseas e com rápido crescimento corporal (KNOWLES e WILKINS, 1998).

Com o aumento da produção de carne de frango, notou-se crescimento na incidência de doenças metabólicas (como ascite e claudicação), infecciosas e redução da fertilidade (BURT, 2002; BURT, 2005). No Brasil, Lopes (2009) relatou a perda de 12 milhões de quilos de carne/ano nos abatedouros devido à problemas locomotores em aves. Segundo o autor, o metabolismo ósseo sofre influência de fatores genéticos e nutricionais, o que provoca diminuição da resistência óssea e conseqüentemente, o aparecimento de problemas locomotores, que resultam em desbalanço esquelético-biomecânico, atribuído possivelmente pelo aumento ao ganho de peso e ao desenvolvimento desproporcional do músculo do peito. Isto resulta em animais com baixo desempenho, rejeição de carcaça, aumento da mortalidade e redução na eficiência da produção comercial.

A seleção para aves com esqueletos mais resistentes já está sendo direcionada nos programas de melhoramento de aves de modo que as características relacionadas à robustez possam ser identificadas e utilizadas como ferramenta na seleção e eliminação de linhagens que apresentem potencial para problemas relacionados às desordens ósseas (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2003).

A genética molecular aliada ao melhoramento animal pode tornar as estratégias convencionais de seleção mais eficientes e promover maiores progressos genéticos em curto prazo (NINOV et al., 2008). Deste modo, o estudo de associações genéticas entre os genes e as características de importância econômica relevantes no melhoramento genético de frangos de corte, tem como intuito direcionar a seleção de forma efetiva para obter animais com alta produção e baixa incidência de problemas relacionados às desordens ósseas.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Panorama da avicultura brasileira no cenário mundial

O Brasil ocupa a posição mundial de líder em exportação e terceiro lugar na produção de frangos, com taxa de crescimento de 4,22% ao ano (MAPA, 2014). O setor de avicultura é responsável por cerca de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, respondendo por cerca de 1,5% do Produto Interno Bruto nacional (ABPA, 2014).

Segundo dados do IBGE divulgados pela Avisite (2014), no primeiro semestre daquele ano, houve crescimento de cerca de 6% no volume de carnes de frangos no Brasil, ainda que tenha sido observado somente 0,94% de aumento no volume dos frangos. Assim, os animais abatidos estão proporcionando volume maior de carne.

1.3.2 Composição do tecido ósseo

O tecido ósseo é composto de cerca de 70% minerais, 20% matéria orgânica e 10% água. A qualidade e resistência óssea é determinada por um conjunto de fatores genéticos, estruturais, composicionais, fisiológicos e nutricionais (RATH et al., 2000). O maior constituinte da matriz orgânica do osso, responsável para a resistência óssea e processo de mineralização, é o colágeno (RIGGS et al., 1993).

De acordo com Rath et al. (2000), a matriz mineral do osso é composta de hidroxiapatita (proveniente do fosfato de cálcio), constituindo cerca de 60-70% do peso do osso e conferindo rigidez e força de compressão. As células que compõe o tecido ósseo como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são imprescindíveis para a composição química, força e geometria do osso bem como síntese da matriz óssea, mineralização e reabsorção. Segundo os autores, o tecido ósseo é caracterizado por processos dinâmicos de formação e eliminação óssea e possui

várias funções importantes, dentre as quais: sustentação do corpo, locomoção, proteção de órgãos internos, reserva metabólica (lipídeos e minerais) e hematopoiese.

O crescimento e desenvolvimento anormal do tecido ósseo e conseqüentemente, a resistência óssea é afetada por diversos fatores. De acordo com Cook (2000) e Rath et al. (2000), fatores endócrinos e genéticos, sexo, idade, nutrientes (toxinas, antinutrientes e deficiências), infecções e estresse, presença de patógenos, micotoxinas e algumas doenças, afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento do esqueleto.

1.3.3 Integridade óssea em galinhas

Problemas locomotores podem estar relacionados com fatores genéticos dos animais, como rápido crescimento e acúmulo do tecido muscular, acompanhado de menor velocidade do desenvolvimento do tecido ósseo (SILVA et al., 2001). A taxa de crescimento é importante fator na resistência óssea, pois o crescimento influencia na massa óssea, que é proporcional à sua resistência óssea (FROST, 1997; SEEMAN, 1999).

Whitehead et al. (2003) descreveram que mecanismos como aumento do requerimento de oxigênio, nutrientes (como por exemplo, a vitamina D), enzimas, hormônios, agentes indutivos, fatores de crescimento e ambientais estão relacionados ao rápido crescimento do animal e afetam o desenvolvimento esquelético. Além disso, os mesmos autores afirmaram que problemas esqueléticos associados com osteomielite (que é uma infecção dos ossos atribuída à ação bacteriana ou fúngica) são decorrentes da diminuição da eficiência do sistema imune causada pelo rápido crescimento do animal.

O intenso processo de seleção genética contribui para o aumento da taxa de má formação óssea em frangos, pois está voltado para o alto ganho de massa e elevadas taxas de crescimento com redução no tempo de abate (BIZERAY et al., 2002). Whitehead et al. (2003) concluíram em seus estudos que há uma correlação

genética desfavorável entre a taxa de crescimento e a incidência de problemas relacionados à integridade óssea em frangos, podendo ser observado ao longo das gerações selecionadas para peso corporal, as quais passaram a ser mais susceptíveis para problemas locomotores.

O melhoramento genético em aves acarretou no desenvolvimento desproporcional do músculo do peito, que pode provocar disfunções estruturais e dor e comprometer a locomoção normal das aves (NESTOR et al., 1985; LILBURN, 1994). De acordo com Almeida Paz et al. (2009), as patologias que acometem o sistema locomotor de animais confinados são de grande importância econômica na produção animal, por resultar em queda no desempenho e piora no bem-estar. Isso ocorre devido à dificuldade do indivíduo em se locomover, acarretando na redução do consumo de água e de alimentos, e impacto na saúde e eficiência produtiva do animal.

A estrutura óssea está intimamente relacionada com os problemas de pernas em frango de corte. Os principais problemas locomotores em frangos de corte são: discondroplasia tibial (DT), Necrose da cabeça do Fêmur (FHN) e Desvio lateral (Valgus) ou medial (Varus) de uma ou das duas pernas (*Valgus-Varus*) (GONZALES e MENDONÇAS JR, 2006). Segundo Riddell (1992), a *Valgus-Varus* é responsável pela claudicação e deformidade esquelética em frangos e perus. Esta doença se manifesta pela rotação do osso da tíbia, devido ao aumento da angulação da tíbia e posicionamento anormal do pé (WHITEHEAD et al., 2003). Uma forma de reverter esta situação seria a seleção para fortalecer a integridade dos ossos. Contudo, as mudanças na integridade óssea em aves têm sido avaliadas utilizando-se técnicas como abate dos animais para análise mineral dos ossos, cinzas e força de resistência à quebra (ZIMMER, 2005).

Desta forma, ressalta-se a importância dos estudos de associação genética no intuito de identificar genes que atuem na expressão dessas características bem como auxiliar os programas de melhoramento genético na definição de critérios de seleção com o intuito de obter progressos genéticos nas características estudadas e minimizar os problemas relacionados à integridade óssea.

1.3.4 Genoma da galinha (*Gallus gallus*)

O genoma da galinha é composto por 38 pares de cromossomos autossomos (sendo 5 macrossomos, 5 intermediários e 28 microcromossomos) e um par de cromossomos sexuais (Z e W): totalizando 78 cromossomos (2n). Diferente dos mamíferos, nas aves a fêmea é o sexo heterogamético (ZW) e o macho é o sexo homogamético (ZZ) (SCHIMD et al., 2005). A anotação do genoma referência da galinha (*Gallus gallus* 4.0) descrita no banco de dados Gene do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) possui tamanho haplóide de 1.200 Mb e consta de 24.416 genes anotados dos quais 20.878 genes são codificantes de proteína. Os microcromossomos da galinha têm taxa de recombinação que varia de 3,9 à 17,1 cM/Mb e taxa de recombinação para macrocromossomos entre 2,7 à 3,2 cM/MB (BURT, 2006). Contudo, o mesmo autor relata que nos seres humanos esta taxa é de cerca de 1 cM/Mb. Essa alta taxa de recombinação faz da galinha um organismo ideal para estudos de ligação gênica, porém, mapas genéticos de alta resolução são necessários para definir a taxa de recombinação dentro dos cromossomos (SCHIMD et al., 2005).

A partir dos estudos dos cromossomos tornou-se possível a construção de mapas de ligação e mapeamento de QTL envolvendo todo o genoma do animal. Groenen et al. (2000) criaram um mapa consenso da galinha a partir dos mapas de ligação de três populações referência (Compton, East Lansing e Wageningen). Schmid et al. (2005) atualizaram este mapa incluindo 372 *loci*, totalizando 4.200 cM distribuídos por 53 grupos de ligação. O mapa consenso contém 801 marcadores microsatélites, que são os mais utilizados para mapeamento de QTL devido ao alto polimorfismo apresentado por este tipo de marcador. Groenen et al. (2009) utilizando 9.268 marcadores, sendo 669 do Mapa Consenso da Galinha (Schmid et al., 2005) e 8.599 SNPs, aperfeiçoaram o mapa com melhores resoluções e comprimento de 3.228 cM. Este mapa fornece informações sobre os marcadores contribuindo para um melhor mapeamento de QTL. O mapeamento genético requer então a presença de polimorfismos detectáveis que estejam em recombinação ou segregação em determinada população. A disponibilidade de um mapa do genoma da galinha, rico

em informações sobre marcadores, possibilita uma análise sistemática da natureza da variação genética de características economicamente importantes em aves.

1.3.5 Loci de características quantitativas (QTL)

Características quantitativas são controladas por um grande número de genes com efeito, denominados poligenes. O segmento de DNA responsável pelas expressões fenotípicas das características quantitativas é chamado de QTL (*“Quantitative Trait Loci”*). Por meio de associações no pedigree entre herança de marcadores genéticos e performance, podemos localizar QTL no genoma (HILLEL, 1997).

A identificação de QTL para características de interesse econômico e de baixa herdabilidade tem viabilizado a seleção assistida por marcadores (MAS) em programas de melhoramento genético de aves. Segundo Van Der Werf (2001), a MAS é importante nas situações em que a acurácia de seleção é baixa, para características de baixa estimativa de herdabilidade ou para características que só podem ser medidas em um dos sexos, no final da vida do animal ou após o abate. Assim, QTL para características economicamente importantes em aves poderão contribuir para aumentar a acurácia de seleção para estas características.

1.3.6 Genes candidatos analisados

Os genes de ação biológica conhecida que possuem relação com características de desenvolvimento ou da fisiologia, são conhecidos como genes candidatos (BRYNE e McMULLEN, 1996). A seleção direta para as características de interesse, na ausência de dados do pedigree, pode ser realizada por meio da definição de variação alélica (BURT, 2002). Segundo a hipótese de Soller (1998) sobre os genes candidatos, a variação funcional dos genes diretamente envolvidos

com as características de interesse, causa a maior porção da variância fenotípica de um *loci* de característica quantitativa (QTL).

Desta forma, em busca de SNP que possam ser utilizados como marcadores moleculares na seleção assistida para as características de interesse neste estudo, selecionamos os genes *RUNX2* (“*Runt-related transcription factor 2*”) e *TNFSF11* (“*Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*”) como genes candidatos por terem sido relacionados na literatura com os mecanismos de desenvolvimento dos tecidos ósseos. Além disso, busca-se identificar possível associação dos genes *RUNX2* e *TNFSF11* com características de desempenho, composição de carcaça e órgãos na população estudada.

1.3.6.1 Gene *RUNX2* (“*Runt-related transcription factor 2*”)

O gene *RUNX2* está relacionado ao desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, atuando como fator de transcrição na formação de osteoblastos (KAMMERER et al., 2013). Mutações no gene *RUNX2* podem acarretar em doenças tais como a displasia cleidocranial (OTTO et al., 2002) que afeta primariamente o sistema esquelético, atingindo ossos membranosos e a ossificação endocondral, podendo ser qualificada como desordem generalizada das estruturas esqueléticas (NEVILLE et al., 2002). A localização do gene *RUNX2* está no cromossomo 3 (NC_006090.3) na região compreendida entre os nucleotídeos 108.922.069 e 109.069.083 (NCBI, 2015).

1.3.6.2 Gene *TNFSF11* (“*Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*”)

O gene *TNFSF11* que apresenta como sinônimo “*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*” (*RANKL*) é uma proteína codificada por um receptor da família

TNF (mais especificamente, o gene *TNFSF11*) importante na regulação do processo de modelação óssea (GENETICS AND HOME REFERENCE, 2013). Além disso, o *TNFSF11* atua na diferenciação e expressão de células dos osteoclastos cuja função é reabsorver a matriz mineralizada dos ossos (USUI et al., 2008). Segundo PEREIRA e PEREIRA (2004), o *TNFSF11* possui papel importante na diferenciação dos osteoclastos (que são derivados de células monocíticas ou macrofágicas e degradam a matriz óssea), pois sua ausência acomete em falhas no desenvolvimento destas células. No genoma da galinha, esse gene está localizado no cromossomo 1 (NC_006088.3) na região entre os nucleotídeos 165.817.349 e 165.837.233 (NCBI, 2015).

1.3.7 Contribuição dos estudos relacionados à integridade óssea para avicultura de corte

A importância dos estudos envolvendo características relacionadas às desordens ósseas em frangos de corte, se dá pela escassez de trabalhos na literatura com estas características, pela dificuldade de mensuração e colheita dos dados fenotípicos realizada somente após o abate dos animais. Além disso, estas características apresentam estimativas de herdabilidade de baixa magnitude, dificultando a seleção com resposta em ganho genético à curto prazo. Tecnologias que aliem a genética quantitativa à molecular com o objetivo de minimizar o impacto causado pelas desordens ósseas decorrentes do intenso processo de seleção para características de desempenho em frangos de corte, são necessárias. Estudos são conduzidos por meio do uso de ferramentas moleculares como a seleção assistida por marcadores a fim de identificar regiões de QTL de genes associados às características de integridade óssea e entender quais os mecanismos biológicos estão envolvidos no processo de mineralização da matriz óssea. Além disto, o entendimento da arquitetura genética da população em relação à estes genes, permitirá compreender como estes genes estão associados com outras características de interesse econômico.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **História da avicultura no Brasil**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 15 out. 2014.

ALMEIDA PAZ, I. C. L.; MENDES, A. A.; MARTINS, M. R. F. B.; FERNANDES, B. C. S.; ALMEIDA, I. C. L.; MILBRADT, E.L.; BALOG, A. e KOMIYAMA, C. M. Follow-up of the development of femoral degeneration lesions in broilers. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 27, n. 2, p. 571-575, 2009.

AVIAGEN. **Improving performance of broilers**. Disponível em <www.aviagen.com>. Acesso em: 10 mar. 2009.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Mudando as exigências. **Avicultura Industrial**, Porto Feliz, v. 8, p. 30-32, 2003.

AVISITE. **O portal da avicultura na internet**. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia/>>. Acesso em: 15 out. 2014.

BIZERAY, D.; ESTEVEZ, I.; LETERRIER, C.; FAURE, M. Influence of increased environmental complexity on leg condition, performance, and level of fearfulness in broilers. **Poultry Science**, Savoy, v. 81, n. 6, p. 767-773, 2002.

BRYNE, P. F.; McMULLEN, M. D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and candidate gene approach. **Probe**, v. 7, p. 24-27, 1996.

BURT, D. W. Applications of biotechnology in the poultry industry. **Worlds Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 58, n. 1, p. 5-14, 2002.

BURT, D. W. Chicken genome: current status and future opportunities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 12, p. 1692-1698, 2005.

BURT, D. The chicken genome. **Genome Dynamics**, Basel, v. 2, p. 123, 2006.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: introduction. **Poultry Science**, Savoy, v. 79, n. 7, p. 982-984, 2000.

FROST, H. M. Obesity and bone strength, and mass: a tutorial based on insight from new paradigm. **Bone**, New York, v. 21, n. 3, p. 211–214, 1997.

GAYA, L. G.; MOURÃO, G. B.; FERRAZ, J. B. S. Aspectos genético-quantitativos de características de desempenho, carcaça e composição corporal em frangos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 709-717, 2006.

GENETICS HOME REFERENCE. **Your guide to understanding genetic conditions**. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 out. 2013.

GONZALES, E.; MENDOÇA J. R. C. X. Problemas locomotores em frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó, SC. **Anais...** p. 79-94.

GROENEN, M. A. M.; CHENG, H. H.; BUMSTEAD, N.; BENKEL, B. F.; BRILES, E.; BURKE, T.; BURT, D. W.; CRITTENDEN, L. D.; DOGSON, J.; HILLEL, J.; LAMONT, S.; LEON, A. P.; SOLLER, M.; TAKAHASHI, H.; VIGNAL, A. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 1, p. 137-147, 2000.

GROENEN, M. A. M.; WAHLBERG, P.; FOGGIO, M.; CHENG, H. H.; MEGENS, H. J.; CROOIJMANS, R. P. M. A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 3, p. 510-519, 2009. Disponível em: <<http://dfx.doi.org/10.1101/gr.086538.108>>.

HILLEL, J. Map-based quantitative trait loci identification. **Poultry Science**, Savoy, v. 76, n. 8, p. 1115-1120, 1997. Disponível em: <<http://dfx.doi.org/10.1093/ps/76.8.1115>>.

KAMMERER, M.; GUTZWILLER, S.; STAUFFER, D.; DELHON, I.; SELTENMEYER, Y.; FOURNIER, B. Estrogen Receptor α (ER α) and Estrogen Related Receptor α (ERR α) are both transcriptional regulators of the Runx2-I isoform. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 369 p. 150-160, 2013.

KNOWLES, T. G.; WILKINS, L. J. The problem of broken bones during the handling of laying hens: a review. **Poultry Science**, Savoy, v. 77, n. 12, p. 1798-1802, 1998.

LILBURN, M. S. Skeletal growth of commercial poultry species. **Poultry Science**, Savoy, v. 73, n. 6, p. 897-903, 1994.

LOPES, R. C. S. O. **Avaliação de fêmures de frango de corte alimentados com farelo de resíduo de manga**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa – MG, Viçosa, 2009, p. 70, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura. **Aves**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 15 out. 2014.

NCBI. Nacional Center for Biotechnology Information. **Gene database**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

NESTOR, K. E.; BACON, W. L.; SAIF, Y. M.; RENNER, P. A. The influence of genetic increases in shank width on body weight, walking ability, and reproduction of turkeys. **Poultry Science**, Savoy, v. 64, n. 12, p. 2248–2255, 1985.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D.; ALLEN, C.; BOUQUOT, J. **Oral and maxillofacial pathology**. Philadelphia: WB Saunders, 2002. p. 389-435.

NINOV, K.; LEDUR, M. C.; ALVES, H. J.; ROSÁRIO, M. F.; NONES, K.; COUTINHO, L. L. Investigation of leptin gene in broiler and layer chicken lines. **Scientiae Agrícola**, Piracicaba, v. 65, n. 2, p. 214-219, 2008.

OTTO, F.; KANEGANE, H.; MUNDLOS, S. Mutations in the *RUNX* gene in patients with cleidocranial dysplasia. **Human Mutation**, New York, v. 19, n. 3, p. 209-216, 2002.

PEREIRA, I. A.; PEREIRA, R. M. R. Osteoporose e erosões ósseas focais na artrite reumatóide: da patogênese ao tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 5, p. 347-354, 2004.

RATH, N. C.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

RIDDELL, C. Non-infectious skeletal disorders of poultry: an overview. In: WHITEHEAD, C. C. (Ed.). **Bone biology and skeletal disorders in poultry**. Abingdon: Carfax Publishing 1992. p. 119-145.

RIGGS, C. M.; VAUGHAN, L. C.; EVANS, G. P.; LANYON, L. E.; BOYDE, A. Mechanical implication of collagen fibre orientation in cortical bone of equine radius. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 239–248, 1993.

ROSÁRIO, M. F.; SILVA, M. A. N.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M. Síndrome ascítica em frangos de corte: uma revisão sobre a fisiologia, avaliação e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1987-1996, 2004.

SCHMID, M.; NANDA, I.; HOEHN, H.; SCHARTL, M.; HAAF, T.; BUERSTEDDE, J. M.; ARAKAWA, H.; CALDWELL, R. B.; WEIGEND, S.; BURT, D. W.; SMITH, J.; GRIFFIN, D. K.; MASABANDA, J. S.; GROENEN, M. A. M.; CROOIJMANS, R. P. M. A.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; MORISSON, M.; PITEL, F.; VIGNOLES, M.; GARRIGUES, A.; GELLIN, J.; RODIONOV, A. V.; GALKINA, S. A.; LUKINA, N. A.; BEN-ARI, G.; BLUM, S.; HILLEL, J.; TWITO, T.; LAVI, U.; DAVID, L.; FELDMAN, M. W.; DELANY, M. E.; CONLEY, C. A.; FOWLER, V. M.; HEDGES, S.B.; GODBOUT, R.; KATYAL, S.; SMITH, C.; HUDSON, Q.; SINCLAIR, A.; MIZUNO, S. Second report on chicken genes and chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n. 4, p. 415-479, 2005.

SCHMIDT, G. S.; ÁVILA V. S. Linhagens avícolas brasileiras. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Novas tecnologias de produção animal**. Piracicaba: FEALQ, 1990. p. 1-6.

SEEMAN, E. The structural basis of bone fragility in men. **Bone**, New York, v. 25, n. 1, p. 143–147, 1999.

SILVA, F. A. da; MORAES, G. H. K. de; RODRIGUES, A. C. P.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; FONSECA, C. C.; FANCHIOTTI, F. E. Efeitos do ácido L-Glutâmico e da vitamina D3 nos fêmures e tibiotarsos de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 2067-2077, 2001.

SOLLER, M. Candidate genes as QTL. In: PLANT e ANIMAL GENOME CONFERENCE, 6., 1998, San Diego. **Proceedings...**

USUI, M.; XING, L.; DRISSI, H.; ZUSCIK, M.; O'KEEFE, R.; CHEN, D.; BOYCE, B. F. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing TNFSF11 in response to BMP2. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 23, n. 3, p. 314-325, 2008.

VAN DER WERF, J. Basics of marker assisted selection. In: KINGHORN, B. E VAN DER WERF, J. (Ed.). **Identifying and incorporation genetic markers and major genes in animal breeding programs**: course notes. Armidale: University of New England, 2001. p. 119-127.

WHITEHEAD, C. C.; FLEMING, R. H.; JULIAN, R. J.; SORENSEN, P. Skeletal problems associated with selection for increased production. **Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology**, Wallingford, v. p. 29-52, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

ZIMMER, L. E. (ed.). **Relatório técnico e de atividades 2004 da Embrapa Suínos e Aves**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. 89 p. (Documentos, 101).

CAPÍTULO 2. ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS, FENOTÍPICOS E AMBIENTAIS PARA CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À INTEGRIDADE ÓSSEA DO FÊMUR E PESO AOS 42 DIAS DE IDADE EM UMA POPULAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO - A intensa seleção em frangos de corte, principalmente para características de desempenho e carcaça, está favorecendo o aparecimento de problemas locomotores nos animais e diminuição da resistência óssea. Por isso, torna-se necessária a realização de estudos relacionados com o desenvolvimento e crescimento do tecido ósseo desses animais a fim de buscar minimizar as perdas relativas no desempenho das aves. Deste modo, parâmetros genéticos foram estimados para características fenotípicas de peso aos 42 dias de idade (P42), rendimento de fêmures resfriados (RPFEM) e medidas tomadas no fêmur: peso (PFEM), teor de cálcio (CA), teor de cinzas (CZ), teor de matéria seca (MS), teor de magnésio (MG), teor de fósforo (P), teor de zinco (ZN), relação cálcio: fósforo (CA:P), força de quebra (FORC), rigidez (RG), comprimento (COMP) e espessura (ESP) em uma população de frangos de corte. Os componentes de variância foram estimados à priori em análises unicaracterística para obtenção dos valores iniciais das variâncias e, posteriormente, em análises multicaracterísticas pelo método de máxima verossimilhança restrita. O modelo incluiu o efeito fixo de grupo (concatenação de sexo e incubação) e efeitos aleatórios genético aditivo e residual. As estimativas de herdabilidade variaram entre 0,10 (0,05) e 0,50 (0,08) para RPFEM e P42, respectivamente, e indicaram que as características possuem componente genético aditivo com magnitude suficiente para responder ao processo de seleção, com exceção do RPFEM que apresentou coeficiente de herdabilidade de baixa magnitude. Estimativas de correlações genéticas com magnitude alta e favorável entre FORC, RG e características relacionadas ao teor de minerais (CA, P, ZN, MG, CA:P) e matéria mineral (CZ) do fêmur indicaram que, a seleção visando resistência à força de quebra do fêmur, acarretará em maiores teores de minerais e matéria mineral nos ossos. Considerando as estimativas de correlações genéticas entre P42 e minerais, ressalta-se que a seleção para P42 poderá ser realizada com

maior ênfase contudo, não irá afetar a integridade óssea do fêmur.

Palavras-chave: cinzas, correlação genética, estimativa de herdabilidade, minerais, peso corporal.

GENETIC PARAMETERS ESTIMATES FOR RELATED TRAITS TO THE INTEGRITY BONE OF THE FEMORAL AND WEIGHT TO 42 DAYS OF AGE IN A BROILER POPULATION

ABSTRACT - The intense selection in broilers, mainly for performance and carcass traits, is favoring the onset of locomotors problems in animals and decreased bone strength. Therefore, it becomes necessary to carry out studies related to the development and growth of bone tissue of these animals in order to minimize losses on the performance of birds. Thus, genetic parameters were estimated for phenotypic traits such as weight at 42 days of age (W42), chilled femurs yield (RPFEM) and measures taken in the femur: weight (PFEM), calcium content (CA), ash content (CZ), dry matter (DM) content of magnesium (MG), phosphorus (P), zinc content (ZN), calcium: phosphorus relation (CA:P), breaking force (FORC), stiffness (RG), length (COMP) and thickness (ESP) in a population of broilers. Variance components were estimated a priori in univariate analysis to obtain the initial values of the variances and later in multivariate analysis by the restricted maximum likelihood method. The model included the fixed effect of group (sex and incubation) and genetic random effects additive and residual. Heritability estimates ranged from 0.10 (0.05) 0.50 (0.08) for RPFEM and W42, respectively, indicating that the traits have additive genetic component with sufficient magnitude to respond to the selection process, except for RPFEM that presented heritability coefficient of low magnitude. Estimates of genetic correlations between high and favorable magnitude between FORC, RG and traits related to mineral content (CA, P, ZN, MG, CA: P) and mineral matter (CZ) of the femur indicated that selection for resistance to force bone breakage will result in higher mineral content and mineral content in the bones. Considering the estimates of genetic correlations between W42 and minerals, it is emphasized that the selection for W42 can be performed, however, will not affect femur integrity bone.

Keywords: ashes, body weight, femur, genetic correlation, minerals.

2.1 INTRODUÇÃO

A competitividade das linhagens de frangos de corte resultou de intensa seleção para características de desempenho corporal e carcaça. Contudo, a seleção que favoreceu o rápido crescimento destes animais, também provocou o aparecimento de problemas locomotores e diminuição da resistência óssea. Desordens esqueléticas são causadas pelo fato do sistema esquelético não estar comportando o aumento de massa corporal (JULIAN, 2005; DIBNER et al., 2007). Segundo Williams et al. (2004), animais com rápido desenvolvimento corporal possuem alta taxa de síntese e absorção nos ossos, o que provoca mineralização insuficiente para sustentar o peso corporal, pois necessitam de ajuste do seu tamanho e geometria, acarretando no comprometimento deste material ósseo. Embora as desordens esqueléticas ocorram desde o início da vida do animal (quando os ossos passam a sofrer o processo de mineralização) os problemas locomotores serão percebidos posteriormente, próximo à idade ao abate destes animais (VAN DER EERDEN et al., 2003; DIBNER et al., 2007; OVIEDO-RONDON et al., 2008; FERKET et al., 2009).

Problemas relacionados à integridade óssea são preocupantes para a indústria avícola devido, principalmente, ao alto índice de descarte no abatedouro em função de carcaças pouco desenvolvidas e com fraturas, e também por causar perdas relativas ao desempenho das aves. Estima-se que cerca de 12 milhões de quilos de carne são perdidos anualmente nos abatedouros do Brasil (LOPES, 2009).

O grande avanço na produtividade avícola é devido principalmente ao melhoramento genético. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi estimar os parâmetros genéticos, fenotípicos e ambientais para as características relacionadas à integridade óssea do fêmur em uma população de frangos de corte com o intuito de fornecer suporte ao processo de seleção.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 População experimental e colheita dos dados

Para realização do presente estudo foi utilizada a base de dados da população referência TT de frangos de corte, do programa de Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/SC. A população referência TT é uma linha paterna de aves de corte, a qual teve sua origem a partir do cruzamento das raças *Cornish*, *Hampshire* e *White Plymouth Rock* e vem sendo selecionada desde 1992, com o objetivo de melhorar o peso corporal, conversão alimentar, rendimentos de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, e redução da gordura abdominal. A população referência TT foi formada a partir da expansão da linha pura de frangos de corte pertencente ao mesmo programa de melhoramento e foi obtida pelo acasalamento de 20 machos com 92 fêmeas (1:5), totalizando cerca de 1.500 progênies.

Foram utilizados pintos de um dia de idade, de ambos os sexos, provenientes de cinco incubações. As aves foram mantidas em boxes coletivos até 35 dias de idade e dos 35 aos 41 dias de idade foram alojadas em gaiolas individuais para a avaliação da conversão alimentar. Os animais foram identificados por meio de anéis metálicos para controle do pedigree, os quais receberam ração inicial do 1º ao 21º dia (21% de proteína bruta e 3.150 kcal de energia metabolizável), ração de crescimento do 22º ao 34º dia (20% de proteína bruta e 3.200 kcal de energia metabolizável) e ração final do 35º ao 41º dia (18,5% de proteína bruta e 3.200 kcal de energia metabolizável).

Aos 42 dias de idade, com um intervalo de 6 horas de jejum, 1.452 aves foram abatidas, diversas características fenotípicas de desempenho e carcaça foram mensuradas e os ossos do fêmur foram colhidos, pesados e armazenados em freezer à -20°C. Este material foi utilizado para as mensuração de características referentes à estrutura óssea. Essa população apresenta banco de DNA genômico, registro de pedigree de cada indivíduo e banco fenotípico com diversas

características de interesse para a avicultura.

2.2.2 Características fenotípicas

Foram avaliadas as seguintes características fenotípicas nas aves abatidas da população TT de frangos de corte: peso aos 42 dias de idade (P42), rendimento de fêmures resfriados (RPFEM) e medidas tomadas no fêmur: peso (PFEM), teor de cálcio (CA), teor de cinzas (CZ), teor de matéria seca (MS), teor de magnésio (MG), teor de fósforo (P), teor de zinco (ZN), relação cálcio: fósforo (CA:P), força de quebra (FORC), rigidez (RG), comprimento (COMP) e espessura (ESP).

Para a avaliação das características do fêmur, os ossos do fêmur de aves foram colocados à temperatura de 0°C por 24 horas e em seguida, o excesso de carne, gordura e cartilagem foi removido manualmente e os ossos foram avaliados quanto ao peso úmido, comprimento entre as extremidades e espessura na região mediana. Após as medições, os ossos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados com o número do indivíduo e armazenados novamente na temperatura de -20°C.

O índice de Seedor (IS) foi obtido pela razão entre o peso e o comprimento do osso (SEEDOR, 1995). Este índice foi usado como indicativo da densidade do fêmur da população, em que quanto maior o índice mais denso o osso. Para determinação da resistência à flexão do fêmur, os ossos foram acondicionados a 0°C por 48 horas e em seguida deixados à temperatura ambiente por cerca de uma hora. O ensaio de flexão foi realizado na máquina TA – XTPlus *Texture Analyzer* ©Texture Technologies Corporation, usando a *probe3-Point Bending Rig* (HDP/3PB), plataforma HDP/90 e célula de carga de 50 kg. Os ossos foram acomodados na mesma posição, com as extremidades apoiadas em dois suportes afastados a 30 mm. A distância percorrida pela *probe* após o toque na amostra foi de 20 mm com velocidade de teste de 2,00 mm/s, velocidade de pré-teste de 2,00 mm/s e velocidade de pós-teste de 20,00 mm/s, e força programada para início da análise (*'trigger force'*) de 5g. Esta força foi aplicada na região central (diáfise) e a resistência

à flexão ou módulo de ruptura determinada. Após o rompimento, os fragmentos ósseos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados com o número da amostra e posteriormente armazenados a 0°C por aproximadamente 24 horas para posterior análise de matéria seca e cinzas.

Para determinação da porcentagem de matéria seca, os fragmentos ósseos do fêmur que estavam a 0°C foram mantidos a temperatura ambiente por cerca de uma hora, acondicionados em cadinhos de porcelana previamente pesados e deixados em estufa à temperatura de 105°C por 16 horas. Após, os cadinhos contendo as amostras foram mantidos no dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida pesados. A porcentagem de matéria seca foi determinada pela razão entre o peso da amostra seca e o peso da amostra úmida.

A determinação da porcentagem de cinzas foi realizada com os fragmentos ósseos logo após a obtenção da matéria seca. As amostras foram incineradas em mufla por seis horas. A temperatura máxima da mufla foi alcançada com aumentos graduais. Inicialmente 350°C por uma hora, 450°C por uma hora, 550°C por uma hora e 600°C por três horas. Em seguida, os cadinhos contendo as amostras foram deixados no dessecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida foram pesados. A porcentagem de cinzas foi determinada pela razão entre o peso das cinzas e o peso da amostra seca. As cinzas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas com o número do indivíduo e armazenadas em ambiente com baixa umidade.

Para determinação dos minerais, a análise foi realizada no resíduo mineral da amostra obtido previamente. Foi feita a solubilização ácida em forno de micro-ondas Anton-Paar Microwave 3000 (Graz, Áustria) equipado com rotor 48MF50 e sensor de controle p/T M50 seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Inicialmente, 0,1g ($\pm 0,0001$) da amostra foi pesado em um tubo de PFA de 50 ml ao qual foi adicionado 6 ml de HCl (aq.) 6 mol/L. O tubo foi introduzido em vaso de decomposição com tampa MF50, posteriormente acomodado em rotor 48MF50. O forno micro-ondas foi operado com rotação constante, taxa de pressão de 0,5 bar/s e potência de 1200W. O tempo de aquecimento para atingir 170°C foi de 15 minutos, temperatura esta mantida por mais 15 minutos. Após a solubilização por radiação micro-ondas, a solução da amostra foi resfriada até temperatura ambiente e o volu-

me corrigido para 100 ml com água ultrapura. Os elementos de interesse foram então, quantificados na solução da amostra. Quando necessário, a solução foi diluída previamente com água ultrapura para adequar a concentração do analito na faixa linear do método de determinação. A quantificação foi realizada por espectrometria de absorção atômica (EAA), no equipamento *VARIAN SpectrAA 220* com atomização em chama equipado com lâmpadas de cátodo oco monoelementares utilizando gás acetileno. Para aquisição dos dados utilizou-se o software *SpectrAA 220 3.0*. Os procedimentos para determinação dos minerais foram detalhados por Cunha Junior (2005).

2.2.3 Análises estatísticas

Os efeitos ambientais considerados no modelo de análise genética foram estudados por meio do método dos quadrados mínimos. O efeito de grupo (concatenação das variáveis incubação e sexo) foi significativo ($P < 0,05$) sobre as características relacionadas à integridade óssea e peso aos 42 dias de idade. A distribuição dos resíduos e demais pressuposições básicas para a condução de análises de variância foram verificadas utilizando o procedimento GLM do programa computacional SAS (SAS 9.1, 2001). Resíduos padronizados acima de 3,5 ou abaixo de -3,5 foram excluídos.

As análises para estimação dos parâmetros genéticos para as características estudadas foram efetuadas pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML), em modelo animal multicaracterística, utilizando o programa computacional WOMBAT, descrito por Meyer (2007). Os valores iniciais requisitados pelo programa foram provenientes das análises de variância, da revisão de literatura e de análises unicaracterística.

O modelo animal proposto para as análises multicaracterística foi:

$$y = Xb + Za + e$$

Em que: y é o vetor da variável dependente, X é a matriz de incidência dos

efeitos fixos, associando elementos de b e y , b é o vetor de efeitos fixos (grupos de animais de mesma incubação e sexo); Z é a matriz de incidência do efeito aleatório genético direto, associando os elementos de a e y , a é o vetor de efeitos aleatórios para o efeito genético aditivo direto e e é o vetor de efeitos residuais. Foram assumidas as seguintes pressuposições: $Var(a)=A\sigma_a^2$ em que A é a matriz de parentesco e σ_a^2 é a variância atribuída aos efeitos genético aditivos e $Var(e)=I\sigma_e^2$ em que I é uma matriz identidade e σ_e^2 é a variância atribuída aos efeitos residuais.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Análises estatísticas

2.4.1.1 Estimativas de herdabilidade, correlações genéticas, fenotípicas e ambientais

Notou-se grande variação fenotípica das características estudadas à partir das estatísticas descritivas (Tabela 1), principalmente quanto à rigidez do fêmur (RG) que apresentou coeficiente de variação superior (41,1%) em relação as demais características. As características MG, FORC, P, CA:P e PFEM demonstraram coeficientes de variação de magnitude moderada. A escassez de trabalhos com relação às características associadas à integridade óssea em frangos de corte, demonstra a necessidade de comparar os trabalhos da literatura a fim de observar possíveis mudanças ocorridas nestas características decorrentes dos processos de seleção.

Tabela 1. Números de animais (N), médias, desvios-padrão (DP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx) e coeficientes de variação (CV) em análises multicaracterísticas, observados para características relacionadas ao peso aos 42 dias de idade e integridade óssea do fêmur em uma população de frangos de corte

Característica	N	Média	DP	Mín	Máx	CV (%)
P42 (g)	1.442	2228,99	252,20	1.349,00	2.971,00	11,31
PFEM (g)	1.410	8,57	1,40	4,96	14,45	16,33
RPFEM (%)	1.423	1,46	0,18	0,98	2,29	12,33
CA (g/kg)	963	313,20	36,56	181,68	601,99	11,67
CZ (%)	961	21,44	1,86	1,61	39,82	8,67
MS (%)	962	51,67	3,50	36,52	62,86	6,77
MG (g/kg)	963	7,46	1,87	4,69	59,98	25,06
P (g/kg)	963	188,35	34,11	110,00	1.066,06	18,10
ZN (mg/kg)	936	374,21	45,60	159,20	560,72	12,18
CA:P (g/kg)	963	1,69	0,30	0,21	2,94	17,75
FORC (kg)	930	29,48	5,93	13,44	49,02	20,11
RG (kg/mm)	906	9,22	3,79	1,05	72,67	41,10
COMP (cm)	1.411	6,96	0,36	7,32	9,34	5,14
ESP (cm)	1.411	9,01	0,80	7,20	11,80	8,88

Peso aos 42 dias de idade (P42), peso do fêmur (PFEM), rendimento de fêmures resfriados (RPFEM), teor de cálcio no fêmur (CA), teor de cinzas no fêmur (CZ), teor de matéria seca no fêmur (MS), teor de magnésio no fêmur (MG), teor de fósforo no fêmur (P), teor de zinco no fêmur (ZN), relação cálcio: fósforo no fêmur (CA:P), força de quebra do fêmur (FORC), rigidez do fêmur (RG), comprimento do fêmur (COMP) e espessura do fêmur (ESP).

A média do P42 encontrada no presente trabalho foi semelhante (Tabela 1) à relatada por Schmidt et al. (2003) (2,27 kg) em linhagem paterna de frangos sob seleção e Koiyama et al. (2014) (2,27 kg) na linhagem Cobb500. Vayego et al. (2008) (2,57 kg) obtiveram média superior à observada neste estudo em linhagem paterna de frangos de corte. Estes resultados indicam que a seleção deve ser aplicada com maior ênfase para P42, a fim de se obter melhor desempenho fenotípico em relação às linhagens comerciais.

Barbosa et al. (2010) estudaram parâmetros morfométricos em frangos de corte híbridos (Hb1) e relataram média inferior de peso aos 42 dias (1884,20 g) e

média superior para peso do fêmur (10,12 g) às relatadas neste trabalho (Tabela 1). Entretanto, os mesmos autores encontraram média superior (7,38 cm), apesar de próxima, para comprimento do osso à obtida neste trabalho ($6,96 \pm 0,36$ cm). Média semelhante à obtida neste trabalho para FORC ($29,48 \pm 5,93$ kg) foi relatada pelos mesmos autores (29,70 kg).

As características físicas do osso do fêmur foram estudadas por Applegate et al. (2002) em frangos comerciais aos 43 dias de idade, sendo relatadas médias superiores para COMP (7,63 cm) e ESP (9,43 cm) às relatadas neste trabalho ($6,96 \pm 0,36$ cm e $9,01 \pm 0,80$ cm, respectivamente). Segundo Williams et al. (2000), o comprimento do osso do fêmur de animais com maior crescimento é menor quando comparado ao peso vivo do animal, pois quanto maior o peso do animal e menor o tamanho do osso, menos momentos de flexão este sofrerá.

Almeida Paz et al. (2007) relataram média de teor de matéria seca inferior (47,11%) à relatada neste trabalho ($51,67 \pm 3,50\%$). O índice Seedor (IS) é um indicativo da densidade, pois quanto maior o valor do índice melhor a qualidade óssea da população (SEEDOR, 1995). O IS calculado pela média dos valores da população no presente trabalho, foi de 1,23, inferior ao relatado pelos mesmos autores de 2,24, em outras populações.

As estimativas de herdabilidade obtidas no presente trabalho por meio de análises multicaracterística (Tabela 2) variaram de 0,10 (0,05) para RPFEM à 0,50 (0,08) para P42. A estimativa de herdabilidade para P42, foi superior às relatadas por Vayego et al. (2008) de $0,37 \pm 0,06$ e Gaya et al. (2006), de $0,24 \pm 0,03$. Os estudos realizados neste trabalho, indicaram que a seleção direta para peso vivo aos 42 dias de idade resultará em progênies mais pesadas pelo fato da característica possuir coeficiente de herdabilidade com alta magnitude, sendo a proporção da variação atribuída aos efeitos genéticos aditivos responsável em parte, pela variação fenotípica da característica nos indivíduos. As características FORC, RG, ZN, ESP, CZ, CA:P, MG, MS, CA e P apresentaram coeficientes de herdabilidade de moderada à alta magnitude, indicando que estas características possuem componente genético aditivo suficiente para responder ao processo de seleção com ganhos genéticos favoráveis. Contudo, os coeficientes de herdabilidade das características RPFEM, PFEM e COMP foram de baixa magnitude (Tabela 2),

demonstrando que existe pouca variabilidade genética aditiva para responder com eficiência ao processo de seleção quando comparadas às demais características estudadas.

Tabela 2. Variâncias genéticas (σ^2_a), variâncias fenotípicas (σ^2_p), variâncias ambientais (σ^2_e) e estimativas de herdabilidade (h^2) obtidas em análises multicaracterísticas, observadas para características relacionadas ao peso aos 42 dias de idade e integridade óssea do fêmur em uma população de frangos de corte

Característica	σ^2_a	σ^2_p	σ^2_e	h^2
P42 (g)	17275,6	34702,4	17426,8	0,50(0,08)
P (g/kg)	37378,6	99227,1	61848,4	0,38(0,01)
MS (%)	49356,0	133949,0	84589,6	0,37(0,01)
MG (g/kg)	53706,5	146656,0	92949,9	0,37(0,01)
CA (g/kg)	25741,9	70313,3	44571,5	0,37(0,01)
CA:P (g/kg)	37021,6	102845,0	65823,4	0,36(0,01)
CZ (%)	51687,2	142097,0	90409,7	0,36(0,01)
ZN (mg/kg)	20239,2	60181,1	39941,9	0,34(0,02)
ESP (cm)	1504,44	4400,1	2895,7	0,34(0,06)
RG (kg/mm)	52149,1	164562,0	112413,0	0,31(0,03)
FORC (kg)	45651,2	148768,0	103117,0	0,30(0,02)
COMP (cm)	3811,0	19154,3	15343,3	0,19(0,07)
PFEM (g)	4010,2	22312,0	18301,8	0,18(0,07)
RPFEM (%)	1071,5	9939,7	8868,3	0,10(0,05)

Características: peso aos 42 dias de idade (P42), teor de fósforo no fêmur (P), teor de matéria seca no fêmur (MS), teor de magnésio no fêmur (MG), teor de cálcio no fêmur (CA), relação cálcio: fósforo no fêmur (CA:P), teor de cinzas no fêmur (CZ), teor de zinco no fêmur (ZN), espessura do fêmur (ESP), rigidez do fêmur (RG), força de quebra do fêmur (FORC), comprimento do fêmur (COMP), peso do fêmur (PFEM) e rendimento de fêmures resfriados (RPFEM).

Souza et al. (2013) observaram, ao estudar ossos da tíbia na mesma população de frangos de corte TT, estimativas de herdabilidade para comprimento da tíbia, espessura da tíbia e teor de matéria seca da tíbia inferiores às relatadas neste trabalho com ossos do fêmur (Tabela 2). Foi relatado coeficiente de herdabilidade superior (0,43) para teor de cinzas na tíbia em relação ao obtido no presente estudo ($0,36 \pm 0,01$) com o osso do fêmur (Tabela 2). Contudo, Ragognetti (2013) encontrou em animais F2 (provenientes de um cruzamento TT X CC) estimativas de herdabilidade para comprimento e peso da tíbia superiores às relatadas neste trabalho para comprimento e peso do fêmur. A estimativa de herdabilidade de FORC (Tabela 2) foi de moderada magnitude, semelhante à relatada por Souza et al. (2013).

O estudo das características relacionadas à integridade óssea é de extrema importância para entender de que forma a seleção para características de desempenho pode afetar o desenvolvimento dos ossos. Além disso, trabalhos na literatura são escassos devido ao fato dessas características serem de difícil mensuração (por serem colhidas somente após o abate dos animais) e possuírem estimativas de herdabilidade com baixo componente genético aditivo.

Mediante a estimativa nula de correlação genética e o erro-padrão superior à estimativa, não foi possível evidenciar associação genética linear (Tabela 3) entre P42 e RG ($0,00 \pm 0,14$). Isto indica que a seleção para peso corporal não influencia na integridade óssea do fêmur.

De acordo com Zhong et al. (2012), que estudaram linhagens comerciais de perus, afirmaram que, embora correlações entre peso corporal e propriedades intrínsecas dos ossos fossem desconhecidas, o peso corporal sempre foi relatado como potencial fator de modulação dos ossos. Com base somente no sinal (negativo) das estimativas das correlações genéticas entre o P42 e o teor de minerais (CA, MG, P, ZN, CA:P) obtidas no presente trabalho (Tabela 3), poderíamos concluir que a seleção para animais mais pesados poderia resultar em menores teores de minerais nos ossos do fêmur, contribuindo para o aparecimento de fraturas ósseas, bem como diminuição da resistência óssea destes animais. Contudo, as estimativas das correlações são pouco confiáveis, uma vez que os erros-padrão estimados foram maiores ou iguais às estimativas das correlações genéticas.

Portanto, não foi possível evidenciar com base neste estudo, que a seleção para P42 acarretará em diferenças de mineralização do nas características constituintes e morfométricas dos ossos do fêmur.

Crespo et al (2002), estudando perus, identificaram que animais mais pesados que apresentavam fraturas nos ossos do fêmur, possuíam o teor de cálcio reduzido em relação à um animal com fêmur íntegro. A mineralização do osso é afetada pela taxa de crescimento (RATH et al., 2000). Zhong et al. (2012) relataram evidências de que diferenças de mineralização contribuam para a integridade óssea, ainda que isso leve tempo. Desta forma, o teor de minerais e cinzas é utilizado como indicativo da resistência óssea.

O PFEM apresentou correlação genética próxima de 1,00 ($0,99 \pm 0,00$) com COMP (Tabela 3), indicando que os mesmos genes estão envolvidos na expressão das características, o que significa que a seleção que favorecesse PFEM também favoreceria COMP. Contudo, devido o fato de que as estimativas de correlações genéticas são baixas e possuem erros-padrão superiores às estimativas, não foi possível determinar associações genéticas entre PFEM e as demais características.

A força de quebra do fêmur é uma característica de suma importância pois além de apresentar componente genético aditivo suficiente para responder à seleção (Tabela 2), é ótimo indicador da qualidade intrínseca do material ósseo, podendo atuar como ferramenta a fim de corrigir desordens relacionadas à integridade óssea. Forte associação genética positiva e favorável de força de quebra do fêmur (FORC) e RG com as características teor de minerais (CA, P, ZN, MG, CA:P) e matéria mineral, no caso, teor de cinzas (CZ), indicam que, a seleção de animais para força de quebra do fêmur e/ou rigidez do fêmur, acarretará em animais com maiores teores de minerais nos ossos, e conseqüentemente, animais com estruturas ósseas mais fortes e com menos problemas de desordens ósseas. Os resultados observados neste trabalho (Tabela 3), contrariam os resultados encontrados por Runho et al. (2001) que, estudando diferenças de níveis de fósforo na dieta de frangos de corte e suas conseqüências na resistência à quebra e teor de minerais nos ossos da tíbia, observaram que teores maiores de cinzas e fósforo encontrados nos ossos, não resultaram em maior resistência à quebra óssea.

Correlações genéticas com menores magnitudes foram observadas entre ESP

e minerais, porém foram positivas e favoráveis. Não foi possível estabelecer associação genética entre COMP e minerais e entre COMP e FORC pelo fato de que as estimativas obtidas são pouco confiáveis, pois apresentaram erros-padrão maiores ou iguais as estimativas. Schmidt et al. (1999) obtiveram correlações genéticas negativas entre comprimento e resistência em ossos da tíbia ao estudarem linhagens puras em frangos de corte, indicando que o aumento no comprimento da tíbia resultaria em diminuição na resistência do osso, resultado este diferente do encontrado neste trabalho. Contudo, os mesmos autores concluíram que a seleção para peso corporal não está correlacionada com a resistência óssea.

Em geral, magnitudes de correlações ambientais foram nulas ou tiveram mesmo sinal e magnitude que as respectivas correlações genéticas. Deste modo, podemos concluir que as interpretações das correlações genéticas podem ser consideradas. Correlações ambientais (Tabela 3) positivas e altas (próximas de 1) observadas entre os minerais, minerais e CZ, minerais e MS, minerais e FORC, minerais e RG, FORC e RG, FORC e CZ, PFEM e COMP indicam que as características respondem ao ambiente no mesmo sentido.

Tabela 3. Correlações genéticas (acima da diagonal) e correlações ambientais (abaixo da diagonal) com respectivos erros-padrão em análises multivariadas para características relacionadas ao peso aos 42 dias de idade e integridade óssea do fêmur em uma população de frangos de corte

Trait	P42	PFEM	RPFEM	CA	CZ	MS	MG	P	ZN	CA:P	FORC	RG	COMP	ESP
P42		-0,1 (0,25)	-0,22 (0,24)	-0,13 (0,14)	-0,13 (0,14)	-0,13 (0,14)	-0,13 (0,14)	-0,17 (0,14)	-0,12 (0,15)	-0,13 (0,14)	-0,06 (0,15)	0,00 (0,14)	-0,09 (0,19)	0,21 (0,14)
PFEM	-0,00 (0,06)		0,10 (0,33)	0,12 (0,19)	0,14 (0,19)	0,13 (0,19)	0,13 (0,19)	0,12 (0,19)	0,11 (0,19)	0,12 (0,19)	0,10 (0,19)	0,08 (0,19)	0,99 (0,00)	0,18 (0,19)
RPFEM	0,04 (0,05)	0,01 (0,04)		0,18 (0,21)	0,17 (0,21)	0,17 (0,21)	0,17 (0,21)	0,16 (0,21)	0,18 (0,22)	0,17 (0,21)	0,16 (0,21)	0,16 (0,21)	0,11 (0,32)	0,29 (0,20)
CA	0,01 (0,07)	0,13 (0,04)	-0,03 (0,04)		0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	1,00 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	1,00 (0,00)	0,97 (0,01)	0,92 (0,03)	0,09 (0,19)	0,21 (0,14)
CZ	0,00 (0,07)	0,14 (0,04)	-0,03 (0,04)	0,98 (0,00)		1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,97 (0,01)	0,91 (0,03)	0,11 (0,19)	0,22 (0,15)
MS	0,00 (0,07)	0,14 (0,04)	-0,03 (0,04)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)		1,00 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	1,00 (0,00)	0,97 (0,01)	0,92 (0,03)	0,11 (0,19)	0,21 (0,14)
MG	0,01 (0,07)	0,13 (0,04)	-0,03 (0,04)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)		0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	1,00 (0,00)	0,97 (0,01)	0,92 (0,03)	0,10 (0,19)	0,22 (0,14)
P	0,03 (0,07)	0,13 (0,04)	-0,03 (0,04)	0,98 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)		0,98 (0,00)	0,99 (0,00)	0,95 (0,02)	0,89 (0,03)	0,09 (0,19)	0,21 (0,14)
ZN	0,01 (0,07)	0,12 (0,04)	-0,04 (0,04)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)		0,99 (0,00)	0,95 (0,02)	0,90 (0,04)	0,08 (0,19)	0,22 (0,15)
CA:P	0,01 (0,07)	0,00 (0,05)	-0,03 (0,04)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,99 (0,00)	0,98 (0,00)	0,89 (0,00)		0,97 (0,01)	0,92 (0,03)	0,09 (0,19)	0,21 (0,14)
FORC	-0,01 (0,06)	0,12 (0,04)	-0,01 (0,04)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)	0,89 (0,00)	0,90 (0,00)	0,89 (0,00)	0,80 (0,01)	0,90 (0,00)		0,98 (0,01)	0,08 (0,19)	0,20 (0,14)
RG	-0,03 (0,06)	0,12 (0,04)	-0,02 (0,04)	0,85 (0,01)	0,84 (0,01)	0,85 (0,01)	0,85 (0,01)	0,85 (0,01)	0,75 (0,01)	0,87 (0,01)	0,94 (0,00)		0,06 (0,19)	0,21 (0,14)
COMP	-0,01 (0,06)	0,98 (0,00)	0,01 (0,04)	0,14 (0,05)	0,16 (0,05)	0,16 (0,05)	0,14 (0,05)	0,14 (0,05)	0,13 (0,04)	0,14 (0,05)	0,13 (0,04)	0,13 (0,04)		0,18 (0,19)
ESP	0,43 (0,06)	0,21 (0,04)	-0,01 (0,04)	0,00 (0,05)	0,01 (0,05)	0,01 (0,05)	0,01 (0,05)	0,01 (0,05)	-0,00 (0,05)	0,00 (0,05)	0,01 (0,05)	-0,00 (0,05)	0,20 (0,04)	

Características (trait): Peso aos 42 dias de idade (P42) em gramas, peso dos fêmur (PFEM) em gramas, rendimento de fêmu resfriados (RPFEM) em %, teor de cálcio no fêmur (CA) g/kg, teor de cinzas no fêmur (CZ) em %, teor de matéria seca no fêmur (MS) em %, teor de magnésio no fêmur (MG) g/kg, teor de fósforo no fêmur (P) g/kg, teor de zinco no fêmur (ZN) em mg/kg, relação cálcio: fósforo no fêmur (CA:P) em g/kg, força de quebra do fêmur (FORC) em kg, rigidez do fêmur (RG) em kg/mm, comprimento do fêmur (COMP) em cm e espessura do fêmur (ESP) em cm.

2.5 CONCLUSÕES

Não foi possível evidenciar com base neste estudo, que a seleção para P42 acarretará em diferenças de mineralização nas características constituintes dos ossos e morfométricas do fêmur. Deste modo, a seleção para P42 poderá ser realizada com maior ênfase a fim de melhorar o desempenho da linhagem estudada em relação às linhagens comerciais. A seleção para FORC e RG resultará em maiores teores de minerais e matéria mineral nos ossos e conseqüentemente, animais com maior resistência à ocorrência de desordens ósseas, porém é necessária a identificação de características geneticamente relacionadas à estas e que possam ser mais facilmente medidas.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA PAZ, I. C. L.; MENDES, A. A.; BALOG, A.; ALMEIDA, I. C. L.; VULCANO, L. C.; KOMIYAMA, C. M. Caracterização da degeneração femoral em frangos de corte por meio da densidade mineral óssea. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 9, n. 1, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2007000100011>>.

APPLEGATE, T. J.; LILBURN, M. S. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. **Poultry Science**, Savoy, v. 81, n. 9, p. 1289-1294, 2002.

BARBOSA, A. A.; MORAES, G. H. K. de; TORRES, R. A.; REIS, D. T. C.; RODRIGUES, C. S.; MÜLLER, E. S. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 772-778, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000400011>>.

CRESPO, R.; STOVER, S. M.; SHIVAPRASAD, H. L.; CHIN, R. P. Microstructure and mineral content of femora in male turkeys with and without fractures. **Poultry Science**, Savoy, v. 81, n. 8, p. 1184-1190, 2002.

CUNHA JUNIOR, A. **Procedimentos analíticos para determinação de minerais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. 22 p.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L.; QUIROZ, M. A. Metabolic challenges and early bone development. **Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, v. 16, n. 1, p. 126-137, 2007.

FERKET, P. R.; OVIEDO-RONDÓN, E. O.; MENTE, P. L.; BOHÓRQUEZ, D. V.; SANTOS, A. A.; GRIMES, J. L.; FELTS, V. Organic trace minerals and 25-hydroxycholecalciferol affect performance characteristics, leg abnormalities, and biomechanical properties of leg bones of turkeys. **Poultry Science**, Savoy, v. 88, n.1, p. 118-131, 2009.

GAYA, L. G.; FERRAZ, J. B. S.; REZENDE, F. M.; MOURAO, G. B.; MATTOS, E. C.; ELER, J. P.; MICHELAN FILHO, T. Heritability and genetic correlation estimates for performance and carcass and body composition traits in a male broiler line. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n. 5, p. 837-843, 2006.

JULIAN, R. J. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry—a review. **The Veterinary Journal**, London, v. 169, n. 3, p. 350-369, 2005.

KOYAMA, N. T. G.; ROSA, A. P.; PADILHA, M. T. S.; BOEMO, L. S.; SCHER, A.; DA SILVA MELO, A. M.; DE OLIVEIRA FERNANDES, M. Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com mistura de aditivos fitogênicos na dieta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 3, p. 225-231, 2014.

LOPES, R. C. S. O. **Avaliação de fêmures de frango de corte alimentados com farelo de resíduo de manga**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa – MG., Viçosa, 2009.

MEYER, K. WOMBAT – a tool for mixed model analyses in quantitative genetics by REML. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v. 8, n. 11, p. 815–821, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2007.B0815>>.

OVIEDO-RONDÓN, E. O.; SMALL, J.; WINELAND, M. J.; CHRISTENSEN, V. L.; GRIMES, J. L.; FUNDERBURK, S. V. L.; MANN, K. M. Effects of incubator temperature and oxygen concentration during the plateau stage of oxygen consumption on turkey embryo long bone development. **Poultry Science**, Savoy, v. 87, n. 8, p. 1484-1492, 2008.

RAGOGNETTI, B. N. N. **Variabilidade genética e identificação de QTLs de tibia e peso corporal em Gallus gallus**. 2013. 49 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, Savoy, v. 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

RUNHO, R. C.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; LOPES, P. S.; POZZA, P. C. Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 187-196, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: Statistics. Cary, NC. 2001. 1464 p.

SCHMIDT, G. S.; MUNARI, D. P.; FIGUEIREDO, E. A. P. de. Mudanças genéticas em linhas puras de frango de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 623-627, 1999.

SCHMIDT, G. S.; COSTA, C. N.; LEDUR, M. C.; AVILA, V. S. Herdabilidade do peso aos 42 dias de linhagens de aves para corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 21, n. 5, p. 772-778, 1992.

SCHMIDT, G. S.; COUTINHO, L. L.; FIGUEIREDO, E. A. P.; LEDUR, M. C.; ALVES, H. J. Morphological genetic markers for selection of broiler lines. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 175-178, 2003.

SEEDOR, J. G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 4, p. 265-270, 1995.

SOUZA, C. G. de; VENTURINI, G. C.; GRUPIONI, N. V.; PEIXOTO, J. O.; LEDUR, M. C.; MUNARI, D. P. Variabilidade genética do peso corporal e integridade óssea da tíbia em uma linhagem paterna de frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 10., 2013, Uberaba. **Anais...** Belo Horizonte: SBMA, 2013.

VAN DER EERDEN, B. C. J.; KARPERIEN, M.; WIT, J. M. Systemic and local regulation of the growth plate. **Endocrine Reviews**, Bethesda, v. 24, n. 6, p. 782-801, 2003.

VAYEGO, S. A.; DIONELLO, N. J. L.; FIGUEIREDO, E. A. P. Estimativas de parâmetros e tendências genéticas para algumas características de importância econômica em linhagem paterna de frangos de corte sob seleção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 7, p. 1230-1235, 2008.

WILLIAMS, B.; SOLOMON, S.; WADDINGTON, D. et al. Skeletal development in the meat type chicken. **British Poultry Science**, Edinburgh, v. 41, n. 2, p. 141-149, 2000.

WILLIAMS, B.; WADDINGTON, D.; MURRAY, D. H.; FARQUHARSON, C. Bone strength during growth: influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. **Calcified Tissue International**, New York, v. 74, n. 3, p. 236-245, 2004.

ZHONG, Z.; MUCKLEY, M.; AGCAOGLU, S.; GRISHAM, M. E.; ZHAO, H.; ORTH, M.; KARCHER, D. M. The morphological, material-level, and ash properties of turkey femurs from 3 different genetic strains during production. **Poultry Science**, Savoy, v. 91, n. 11, p. 2736-2746, 2012.

CAPÍTULO 3. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES *RUNX2* E *TNFSF11* COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, ORGÃOS, CARÇAÇA E INTEGRIDADE ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – A intensa seleção para características de desempenho e carcaça está favorecendo o aparecimento de problemas locomotores nos animais e diminuição da resistência óssea em frangos de corte. Desta forma, genes associados com características relacionadas à integridade óssea, tornam-se candidatos em estudos genéticos, a fim de reduzir o impacto causado em consequência de desordens ósseas no sistema de produção. Deste modo, objetivou-se investigar a associação de polimorfismos nos genes *RUNX2* e *TNFSF11* com características de desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte. Foi realizada a genotipagem de 1.453 animais da população referência TT pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves. A técnica de PCR-RFLP foi realizada para a detecção dos SNPs, utilizando a enzima de restrição *BtsCI* para o SNP g.57.397A>G no gene *RUNX2* e a enzima *Hinfl* para o SNP g.14.614A>G no gene *TNFSF11*. Análises de associação genética entre os SNPs e as características estudadas foram realizadas no programa QxPak que utiliza procedimentos de máxima verossimilhança para modelos mistos. Foram incluídos os efeitos fixos de incubação, sexo e do SNP, assim como os efeitos aleatórios do animal e do erro associado ao modelo. Foi verificada associação genética significativa ($P < 0,05$) entre o SNP g.57.397A>G no gene *RUNX2* e as características peso aos 21 dias, consumo de ração dos 35-41 dias, ganho de peso dos 35-41 dias, peso de sangue e penas, peso da pele do peito, peso do pulmão, rendimento de sangue e penas, rendimento de pele e carne do peito. Quanto ao SNP g.14.614A>G no gene *TNFSF11*, associações genéticas significativas ($P < 0,05$) foram encontradas com as características peso ao nascimento, peso e rendimento do coração enquanto que associações genéticas sugestivas ($P < 0,10$) foram observadas para gordura abdominal e seu respectivo rendimento. Concluiu-se que a seleção à favor do SNP g.14.614A>G no gene *TNFSF11* pode ser realizada no intuito de minimizar a deposição de gordura abdominal e melhorar a qualidade da carcaça dos frangos de corte.

Palavras-chave: integridade óssea do fêmur, órgãos, PCR-RFLP, seleção genética, SNP.

STUDY OF THE ASSOCIATION OF THE *RUNX2* AND *TNFSF11* GENES WITH PERFORMANCE TRAITS, ORGANS, CARCASS AND BONE INTEGRITY OF A PATERNAL BROILER LINEAGE

ABSTRACT – The intense selection for performance and carcass traits is favoring the onset of locomotors problems and decreasing bone strength in broilers. Thus, genes associated with traits related to bone integrity, became candidates for genetic studies in order to reduce the impact of bone disorders on the production system. This study investigated the association of *RUNX2* and *TNFSF11* genes with performance traits, carcass composition, organs and bone integrity in a paternal broiler lineage. A total of 1,453 animals of the TT reference population from poultry breeding program of Embrapa Swine and Poultry were genotyped. PCR-RFLP using the restriction enzymes *BtsCI* and *Hinfl*, was performed to detect SNPs in the g.57.397A>G *RUNX2* and g.14.614A>G *TNFSF11*, respectively. Analysis of genetic associations between the SNPs and traits was carried out using the maximum likelihood procedures for mixed models of the QxPak software. The fixed effects were incubation, sex and SPN while the random effects were animals and model associated error. Significant genetic association was found ($P<0.05$) between the SNP g.57.397A>G *RUNX2* gene and the traits weight at 21 days; feed intake and weight gain between 35 and 41 days; as well as weights of blood and feather, breast skin and lung; and yields of blood and feather, skin and breast meat. Significant genetic associations ($P<0.05$) were found between the SNP g.14.614A>G in *TNFSF11* gene and the traits birth weight, heart weight and yield, while suggestive genetic associations were found with fat abdominal and fat abdominal yield. It was concluded that the selection for SNP g.14.614A>G in *TNFSF11* gene can be used in order to reduce abdominal fat deposition and improve quality carcass in broilers.

Keywords: body weight, femur bone integrity, genetic selection, PCR-RFLP, SNP.

3.1 INTRODUÇÃO

Em busca de produtos com qualidade para atender às exigências do mercado interno e externo, melhoristas de frango de corte tem selecionado cada vez mais, aves para rápido crescimento e ganho de peso. Com isso, a incidência de problemas relacionados às desordens ósseas nos animais vem sendo cada vez mais observada, pois o desenvolvimento ósseo requer mais tempo que o rápido crescimento permite. Deste modo, é importante estudar problemas relacionadas à integridade óssea pois estes contribuem para decréscimo na produção, mortalidade e condenações de carcaças animais (RATH et al., 2000).

O desenvolvimento esquelético dos animais pode ser influenciado por genes que atuam na taxa de crescimento inicial, os quais podem ser observados por meio da correlação genética entre pesos, ganhos de pesos e características de integridade óssea, permitindo a manipulação por meio da seleção. A identificação de genes candidatos associados à integridade óssea do fêmur, pode auxiliar na escolha de marcadores para atuar no estudo de seleção genética para características relacionadas à resistência óssea, visando reduzir as desordens decorrentes do intenso processo de seleção para crescimento em frangos de corte.

O gene “Runt-related transcription factor 2” (*RUNX2*) se apresenta como potencial gene candidato para estudar as características relacionadas à integridade óssea, uma vez que está relacionado ao desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, atuando como fator de transcrição na formação de osteoblastos (KAMMERER et al., 2013). Mutações no gene *RUNX2* podem acarretar doenças tais como a displasia cleidocranial (OTTO et al., 2002) que afeta primariamente o sistema esquelético, atingindo ossos membranosos e a ossificação endocondral, podendo ser classificada como desordem generalizada das estruturas esqueléticas (NEVILLE et al., 2002). O gene *RUNX2* localizado no cromossomo 3 (GGA3) do genoma da galinha, possui tamanho de 147.015 pb, localizado entre 108.922.069 e 109.069.083 pb. Este gene possui 8 éxons e 7 íntrons. Há 597 SNPs descritos no dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) para este gene nesta espécie.

O “Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11” (*TNFSF11*) desempenha papel importante na regulação do processo de modelação óssea

(GENETICS AND HOME REFERENCE, 2013). Além disso, o gene atua na diferenciação e expressão de osteoclastos cuja função é reabsorver a matriz mineralizada óssea (USUI et al., 2008). O gene *TNFSF11* localizado no cromossomo 1 (GGA1) do genoma da galinha, possui tamanho de 19.885 pb, localizado entre 165.817.349 e 165.837.233 pb. Este gene possui 6 éxons e 5 íntrons. Há 142 SNPs descritos para este gene nesta espécie no banco de dados do dbSNP.

A importância do estudo destes genes se deve ao fato de que características relacionadas à integridade óssea são de difícil mensuração uma vez que possuem estimativas de herdabilidade de baixa magnitude e requerem o abate dos animais para colheita dos dados. Deste modo, o uso de técnicas moleculares favoreceria a identificação de outras características de interesse econômico associadas à estes genes que poderiam ser utilizadas como critério de seleção indireta à fim de se obter ganhos genéticos favoráveis quanto à redução dos problemas causados pelas desordens ósseas em frangos de corte.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a associação de polimorfismos nos genes *RUNX2* e *TNFSF11* com características relacionadas ao desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte, uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura que associem estes genes com estas características.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 População e colheita dos dados fenotípicos

Foi utilizada a base de dados da população referência TT de frangos de corte, do programa de Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/SC, Brasil. A população referência TT é uma linha paterna de aves de corte, a qual teve sua origem a partir do cruzamento das raças *Cornish*, *Hampshire* e *White Plymouth Rock*, e vem sendo selecionada desde 1992, com o objetivo de melhorar o peso corporal, conversão alimentar, rendimentos de carcaça e partes,

viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, redução da gordura abdominal. A população referência TT foi formada a partir da expansão da linha pura de frangos de corte pertencente ao mesmo programa de melhoramento e foi obtida pelo acasalamento de 20 machos com 92 fêmeas (1:5), totalizando cerca de 1.500 progênies.

Foram utilizados pintos de um dia de idade, de ambos os sexos, provenientes de cinco incubações. As aves foram mantidas em boxes coletivos até 35 dias de idade e dos 35 aos 41 dias de idade foram alojadas em gaiolas individuais para a avaliação da conversão alimentar. Os animais foram identificados por meio de anéis metálicos para controle do pedigree e receberam ração inicial do 1º ao 21º dia (21% de proteína bruta e 3.150 kcal de energia metabolizável), ração de crescimento do 22º ao 34º dia (20% de proteína bruta e 3.200 kcal de energia metabolizável) e ração final do 35º ao 41º dia (18,5% de proteína bruta e 3.200 kcal de energia metabolizável).

Aos 42 dias de idade, com um intervalo de 6 horas de jejum, 1.453 aves foram abatidas. A colheita de sangue para extração de DNA foi realizada durante a sangria no momento do abate. Aproximadamente 2 mL de sangue foram colhidos da jugular e armazenados em microtubos de 2 mL que continha 100 µL (10% v/v) do anticoagulante EDTA 0,5 M. Durante a colheita, diversas características fenotípicas de desempenho e carcaça foram mensuradas e os ossos do fêmur foram colhidos, pesados e armazenados em freezer à -20°C.

Para a avaliação das características do fêmur, os ossos do fêmur de aves foram colocados à temperatura de 0°C por 24 horas e em seguida, o excesso de carne, gordura e cartilagem foi removido manualmente e os ossos foram avaliados quanto ao peso úmido, comprimento entre as extremidades e espessura na região mediana. Após as medições, os ossos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados com o número do indivíduo e armazenados novamente na temperatura de -20°C.

O índice de Seedor (IS) foi obtido pela razão entre o peso e o comprimento do osso (SEEDOR, 1995). Este índice foi usado como indicativo da densidade do fêmur da população, em que quanto maior o índice mais denso o osso. Para determinação da resistência à flexão do fêmur, os ossos foram acondicionados a 0°C por 48 horas e em seguida deixados à temperatura ambiente por cerca de uma hora. O ensaio de flexão foi realizado na máquina TA – XTPlus *Texture Analyzer* ©Texture Technologies Corporation, usando a *probe3- Point Bending Rig* (HDP/3PB), plataforma HDP/90 e célula de carga de 50 kg. Os ossos foram acomodados na mesma posição, com as

extremidades apoiadas em dois suportes afastados a 30 mm. A distância percorrida pela *probe* após o toque na amostra foi de 20 mm com velocidade de teste de 2,00 mm/s, velocidade de pré-teste de 2,00 mm/s e velocidade de pós-teste de 20,00 mm/s, e força programada para início da análise (*'trigger force'*) de 5g. Esta força foi aplicada na região central (diáfise) e a resistência à flexão ou módulo de ruptura determinada. Após o rompimento, os fragmentos ósseos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados com o número da amostra e posteriormente armazenados a 0°C por aproximadamente 24 horas para posterior análise de matéria seca e cinzas.

Para determinação da porcentagem de matéria seca, os fragmentos ósseos do fêmur que estavam a 0°C foram mantidos a temperatura ambiente por cerca de uma hora, acondicionados em cadinhos de porcelana previamente pesados e deixados em estufa à temperatura de 105°C por 16 horas. Após, os cadinhos contendo as amostras foram mantidos no dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida pesados. A porcentagem de matéria seca foi determinada pela razão entre o peso da amostra seca e o peso da amostra úmida.

A determinação da porcentagem de cinzas foi realizada com os fragmentos ósseos logo após a obtenção da matéria seca. As amostras foram incineradas em mufla por seis horas. A temperatura máxima da mufla foi alcançada com aumentos graduais. Inicialmente 350°C por uma hora, 450°C por uma hora, 550°C por uma hora e 600°C por três horas. Em seguida, os cadinhos contendo as amostras foram deixados no dessecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida foram pesados. A porcentagem de cinzas foi determinada pela razão entre o peso das cinzas e o peso da amostra seca. As cinzas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas com o número do indivíduo e armazenadas em ambiente com baixa umidade.

Para determinação dos minerais, a análise foi realizada no resíduo mineral da amostra obtido previamente. Foi feita a solubilização ácida em forno de micro-ondas Anton-Paar Microwave 3000 (Graz, Áustria) equipado com rotor 48MF50 e sensor de controle p/T M50, seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Inicialmente, 0,1g ($\pm 0,0001$) da amostra foi pesado em um tubo de PFA de 50 ml ao qual foi adicionado 6 ml de HCl (aq.) 6 mol/L. O tubo foi introduzido em vaso de decomposição com tampa MF50, posteriormente acomodado em rotor 48MF50. O forno micro-ondas foi operado com rotação constante, taxa de pressão de 0,5 bar/s e

potência de 1200W. O tempo de aquecimento para atingir 170°C foi de 15 minutos, temperatura esta mantida por mais 15 minutos. Após a solubilização por radiação micro-ondas, a solução da amostra foi resfriada até temperatura ambiente e o volume corrigido para 100 ml com água ultrapura. Os elementos de interesse foram então quantificados na solução da amostra. Quando necessário, a solução foi diluída previamente com água ultrapura para adequar a concentração do analito na faixa linear do método de determinação. A quantificação foi realizada por espectrometria de absorção atômica (EAA), no equipamento *VARIAN SpectrAA 220* com atomização em chama equipado com lâmpadas de cátodo oco monoelementares utilizando gás acetileno. Para aquisição dos dados utilizou-se o software *SpectrAA 220 3.0*. Os procedimentos para determinação dos minerais foram detalhados por Cunha Junior (2005).

Foram avaliadas 80 características do banco de dados da população referência TT, relacionadas ao desempenho, composição de carcaça e órgãos e integridade óssea em frangos de corte.

As características relacionadas ao desempenho foram: peso ao nascimento (PNAS), peso aos 21 dias (P21), peso aos 35 dias (P35), peso aos 41 dias (P41), peso aos 42 dias (P42), consumo de ração dos 35 aos 41 dias (CR35-41), ganho de peso dos 35 aos 41 dias (GP35-41) e conversão alimentar dos 35 aos 41 dias (CA35-41).

As características relacionadas à composição de carcaça e órgãos foram: peso pós-sangria e depena (PPSD), peso de sangue e pena (SP) e rendimentos (RSP), peso da carcaça resfriada (PCR) e rendimento (RC), gordura abdominal (GA) e rendimento (RGA), peso da cabeça (CAB) e rendimento (RCAB), peso dos pés (PES) e rendimento (RPES), peso do fígado (FIG) e rendimento (RFIG), peso do coração (COR) e rendimento (RCOR), peso da moela (MO) e rendimento (RMO), peso das coxas da asa (CASA) e rendimento (RCASA), peso do meio da asa (MASA) e rendimento (RMASA), peso da ponta da asa (PASA) e rendimento (RPASA), peso da tíbia resfriada (PTIB) e rendimento (RPTIB), peso da pele da coxa (PELCX) e rendimento (RPELCX), peso da carne da coxa (CARCX) e rendimento (RCARCX), peso dos fêmures resfriados (PFEM) e rendimentos (RPFEM), peso da pele da sobrecoxa (PELSCX) e rendimento (RPELSCX), peso da carne da sobrecoxa (CARSCX) e rendimento (RCARSCX), peso da carne das coxas e sobrecoxas (CARCXSCX) e rendimento (RCARCXSCX), peso de pele do peito (PELPT) e

rendimento (RPELPT), peso da carne do peito (CARPT) e rendimento (RCARPT), peso do filé de peito (FILPT) e rendimento (RFILPT), peso do osso do peito (OSPT) e rendimento (ROSPT), peso do dorso (DORS) e rendimento (RDORS), peso do pescoço (PESC) e rendimento (RPESC), peso do pulmão (PUL) e rendimento (RPUL), peso da asa (ASA) e rendimento (RASA), peso do peito (PT) e rendimento (RPT), peso das coxas (CX) e rendimento (RCX).

As características relacionadas à integridade óssea foram: peso da tíbia (PESO_TIBIA), rendimento de tíbias resfriadas (RTIB), comprimento da tíbia (COMP_TIBIA), espessura da tíbia (ESP_TIBIA), peso do fêmur (PESO_FEM), rendimento de fêmures resfriados (RPFEM), comprimento do fêmur (COMP_FEM), espessura do fêmur (ESP_FEM), curvatura do fêmur (SCORE), força de quebra do fêmur (FEM_FORC), força de quebra da tíbia (TIB_FORCA), teor de matéria seca do fêmur (FEM_M_S), teor de matéria seca da tíbia (TIB_MS), teor de cinzas do fêmur (FEM_CZ) e teor de cinzas da tíbia (TIB_CZ).

3.2.2 Análise laboratorial para obtenção dos genótipos

3.2.2.1 Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico dos animais foi extraído utilizando o protocolo de extração de DNA com o reagente DNAzol® (Invitrogen). As amostras de sangue foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas manualmente. Em seguida, 500 µL de DNAzol® foram adicionados a 15 µL de sangue total conservado em EDTA 0,5 M e homogeneizados. Logo após, foram adicionados 500 µL de etanol absoluto e os tubos foram cuidadosamente invertidos várias vezes. Removeu-se o precipitado do tubo com auxílio de micropipetador. Em seguida, foi realizada a lavagem adicionando 1 mL de etanol 95% seguida de centrifugação por 10 minutos à 3.500 ×g. Uma segunda lavagem foi realizada com 1 mL de etanol 75% sob as mesmas condições de centrifugação. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* desidratado à temperatura ambiente por 30 minutos. Em

seguida, o DNA foi ressuspenso em 150 μL de água ultra pura, incubado à 37°C por 1 hora em banho-maria e armazenado em freezer a -20°C até sua utilização.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro BioPhotometer™ (Eppendorf) e as amostras tiveram suas concentrações ajustadas para 25 ng/ μL .

3.2.2.2 Identificação dos SNPs por meio de reações de sequenciamento

No banco de dados Gene do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) foram obtidas informações referentes aos genes estudados no presente trabalho. Os *primers* foram então desenhados utilizando o programa Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus/). Para identificação de SNPs, foram amplificados por PCR amostras de DNA de 15 animais e o produto de PCR foi sequenciado em equipamento ABI 3130XL (Applied Biosystems) (Tabela 1). As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o protocolo do *kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)*. Para cada reação de sequenciamento foram utilizados: 2 μL de Tampão *Save Money* (200 mM de Tris pH 9.0, 0,5 mM MgCl_2), 1 μL de *primer* (2,5 pmoles/ μL), 2 μL de *Kit BigDye* e 50 ng de DNA. A reação de sequenciamento compreendeu as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 60°C por um minuto, totalizando 25 ciclos.

Tabela 1. Sequência dos *primers*, número de acesso no banco de dados GenBank e tamanho dos fragmentos dos genes sequenciados

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Nº de acesso GenBank	Tamanho (PCR)
<i>RUNX2-F</i>	5'-TAGGTAAGTGGGCCAGCATCCAAA-3'	NC_006090.3	1.044 bp
<i>RUNX2-R</i>	3'-TACCACCGACTGAGCTTTGCTCTT-5'		
<i>TNFSF11-F</i>	5'-CTGTGGTGCCTGATGTCTGT-3'	NC_006088.3	961 bp
<i>TNFSF11-R</i>	3'-GCCTCAATAGAGCCTTCCCC-5'		

As sequências de DNA obtidas foram analisadas utilizando o *Software Phred/Phrap/Consed/PolyPhred* (EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998; NICKERSON; TOBE; TAYLOR, 1997). Foram selecionadas as sequências de DNA com qualidade (*Phred*) superior ou igual a 20. Os SNPs dos genes *RUNX2* e *TNFSF11*, foram posteriormente genotipados na população TT por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*).

3.2.2.3 Reação de PCR-RFLP

A seleção das enzimas de restrição que reconhecem os sítios específicos em que foram identificados os SNPs foi realizada utilizando o programa NEBcutter (VINCZE et al., 2003). As enzimas utilizadas para avaliar os respectivos SNPs identificados nos genes *TNFSF11* e *RUNX2* foram *Hinfl* (5' G↓ANTC 3') e *BtsCI* (5' GGATGNN↓ 3'), respectivamente. O SNP do gene *TNFSF11* localizado na posição g.14.614A>G encontra-se no íntron 5, enquanto que o SNP do gene *RUNX2* encontra-se na posição g.57.397A>G e está localizado no íntron 6.

Para a amplificação de fragmentos de DNA nos genes *RUNX2* e *TNFSF11* que apresentaram polimorfismos, reações de PCR foram padronizadas conforme descrito a seguir. Foram utilizados 2 µL de DNA genômico (25 ng/µL) adicionados a 22 µL do *mix* de reação composto pelos seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão 10 X (10X High Fidelity Buffer [600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄]), 1 µL de MgSO₄ (50 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL de cada *primer* (2,5 moles/µL), 0,1 µL (1U) de enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), para um volume final de 25 µL.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por um minuto a 95°C, seguido de uma nova desnaturação por um minuto a 95°C, anelamento a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, com extensão final seguida de 72°C durante 10 minutos. Foram realizados 30 ciclos nas reações para cada um dos pares de *primers* dos respectivos genes.

As análises de RFLP, foram realizadas em um total de 10 µL utilizando 5 µL do

produto de PCR, 1U da enzima de restrição e 1 µL do tampão da enzima. A digestão ocorreu *overnight* à 37°C com a enzima *Hinfl* e à 50°C com a enzima *BtsCI*.

Os produtos da PCR-RFLP foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, submetido à corrente elétrica de 80 V por 50 minutos em TBE 1X (Tris-Ácido Bórico-EDTA) e observado em transluminador com luz ultravioleta. Para verificação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado marcador molecular de 100 pb (*Invitrogen*).

3.2.2.4 Análises estatísticas

Para cada um dos SNPs genotipados foi realizada a análise da frequência genotípica pelo procedimento FREQ do SAS (SAS 9.1, 2001). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para cada SNP pelo teste qui-quadrado (χ^2), com 1 grau de liberdade a 5% de significância no intuito de verificar se a população estudada encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (hipótese de nulidade).

As análises de associação entre os SNPs e as características fenotípicas foram realizadas utilizando o programa QxPak v. 4.1 (PEREZ-ENCISO; MISZTAL, 2004), que utiliza procedimentos de máxima verossimilhança para modelos mistos, por meio do modelo linear geral:

$$y_{ijklm} = \mu + a_{ijkl} + I_i + S_k + SNP_l + e_{ijklm}$$

Em que: y_{ijklm} = representa o valor do fenotípico da característica; μ = média geral da característica; I_i = efeito fixo da *i*-ésima incubação (com $i=1...5$); a_{ijkl} = efeito aleatório do *j*-ésimo animal do sexo *k* da incubação *i* ($j= 1...510$); S_k = efeito fixo do *k*-ésimo sexo ($k= 1, 2$); SNP_l = efeito fixo do *l*-ésimo genótipo ($l = 11, 12, 22$); e_{ijklm} = erro aleatório. Neste modelo foram avaliados os efeitos aditivo (a), aditivo + desvios de dominância (ad) e desvios de dominância (d) do SNP. Após, esses modelos foram ajustados considerando a interação com o sexo, para avaliar se o SNP apresentava efeito diferente em relação a machos e fêmeas.

Foram utilizados os seguintes procedimentos, no programa Qxpak, para

verificação dos possíveis efeitos dos SNPs nas características estudadas:

Efeito aditivo do SNP (snp_a): indivíduos com genótipos do marcador '11', '12' e '22' assumem valores genéticos K_{AA} , 0 e K_{GG} , respectivamente. Os genótipos '12' e '21' foram tratados de forma idêntica.

Efeito aditivo e de desvios de dominância do SNP (snp_ad): indivíduos com genótipos do marcador '11', '12' e '22', valores genéticos assumem K_{AA} , K_{AG} e K_{GG} , respectivamente.

Efeito de desvios de dominância do SNP (snp_d): indivíduos com genótipo marcador '11', '12' e '22', valores genéticos assumem 0, K_{AG} e 0, respectivamente.

Considerou-se o tipo de dominância parcial ($0 < d/a < a$ ou $-a < d/a < 0$), completa ($d/a=1$) e sobredominância ($d/a>1$) em função da razão do efeito de dominância pelo efeito aditivo.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os SNP dos genes *TNFSF11* e *RUNX2* apresentaram as três classes genóticas (AA, AG e GG) (Tabela 2) na população estudada. O alelo G apresentou maior frequência em relação ao A nos marcadores estudados. A frequência alta do alelo G para o SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11* indica que o efeito de substituição alélica é favorável do alelo A para o alelo G. As frequências dos genótipos heterozigotos foram de 12,8% para o SNP g.14.614A>G no gene *TNFSF11* e 46,4% para o SNP g.57.397A>G no gene *RUNX2*, respectivamente. De acordo com Peixoto et al. (2012) altas frequências permitem o cálculo do valor aditivo dos marcadores pelo fato de serem obtidos por meio dos contrastes entre homozigotos. Um estudo em humanos identificou associação genética entre o gene *TNFSF11* e características relacionadas à densidade mineral do osso e fraturas ósseas em mulheres (RICHARDS et al., 2009).

Tabela 2. SNP do gene, número de animais genotipados (N), número de animais por genótipo e respectivas frequências genotípicas, entre parênteses, e frequências alélicas em uma população de frangos de corte

SNP/Gene	N	Genótipo			Alelo	
		AA	AG	GG	A	G
SNP g.14.614A>G (<i>TNFSF11</i>)	1.264	30(2,4)	162(12,8)	1072 (84,8)	0,0878	0,9122
SNP g.57.397A>G (<i>RUNX2</i>)	1.154	165(14,3)	536(46,4)	453(39,3)	0,3750	0,6250

A partir do teste Qui-quadrado (χ^2), verificou-se que a população não está em equilíbrio de Hardy-Weiberg ($\chi^2=50,51$; $P<0,05$) para o SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11*. A baixa frequência genotípica dos homozigotos do SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11*, pode ser atribuída ao processo de seleção que a população vem sofrendo, principalmente para características de desempenho, causando o desequilíbrio de Hardy-Weinberg e alterando a frequência alélica do referido marcador na população estudada.

O SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* apresentou alta frequência de heterozigotos na população estudada, que reflete em elevada variabilidade genética da população, além de apresentar potencial para ser utilizado na seleção destes animais. Segundo Sebbenn et al. (2000), este resultado, além de indicar variabilidade genética, possibilita novas combinações genotípicas e maior capacidade de adaptação às mudanças ambientais, resultando no aumento do potencial evolutivo desta espécie. Contudo, o SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* ($\chi^2=0,10$; $P>0,05$) encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não está sofrendo seleção nesta população.

Os resultados das estatísticas descritivas para os marcadores com efeito aditivo significativo ($P<0,05$) e sugestivo ($P<0,10$) (Tabela 3) indicam que o SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* é responsável por parte das variações fenotípicas para as características relacionadas ao desempenho como PELPT, GP35-41, P21, RPELPT, CR35-41, P42, P41 e as características relacionadas aos pesos dos órgãos PUL e FIG; podendo ser considerado na seleção. O SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11* também afetou às variações fenotípicas nas características de COR,

RCOR, GA e RGA (Tabela 3).

O SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* e SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11*, apresentaram efeito aditivo e de desvios de dominância, indicando que a seleção assistida desses marcadores favorecerá as características de desempenho (Tabela 3). Contudo, a substituição alélica para os SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* e g.14.614A>G do gene *TNFSF11* não é favorável para SP e RSP respectivamente, pois a seleção em favor destes SNPs para estas características poderá gerar maior quantidade de resíduos no abate dos animais. As características SCORE, COR, RCOR, RCARCX do SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* e RCARPT do SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11* apresentaram somente efeito aditivo dentro sexo (Tabela 3).

As característica relacionadas à integridade óssea do fêmur apresentaram efeito significativo de desvios de dominância do SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* para PFEM e RPFEM com coeficiente de variação de 14,95% e 12,33%, respectivamente (Tabela 3). O SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11* explicou parte da variação fenotípica de GP35-41. Contudo, a seleção direta dos SNP estudados em favor destas características com base nos desvios de dominância não seria eficiente pois dependeria da forma como os alelos interagiriam entre si.

Tabela 3. SNP do Gene, característica, número de animais (N), média e seu respectivo desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (Min) e máximo (Max), para as características com associações significativas ($P < 0,05$) e sugestivas ($P < 0,10$) para diferentes tipos de efeitos dos SNPs estudados, em uma população de frangos de corte pelo método da máxima verossimilhança no programa Qxpak

SNP/Gene	Característica	N	Média (DP)	CV (%)	Min	Max
SNP g.57.397A>G (RUNX2)	CR35-41 ^a	1.147	1.092,08(156,21)	14,30	544,00	1.590,00
	RSP ^a	1.146	7,62(1,03)	13,52	3,88	11,31
	RPELPT ^a	1.139	1,41(0,25)	17,73	0,61	2,42
	P41 ^{a*}	1.147	2.219,88(252,19)	11,36	1.026	2.922
	P42 ^{a*}	1.153	2.222,73(260,90)	11,74	988	2.971
	FIG ^{a*}	1.131	52,41(8,91)	17,00	30,10	82,40
	RC ^{a*}	1.139	73,59(1,68)	2,29	63,56	79,78
	ASA ^{a*;b}	1.134	166,94(19,69)	11,80	72,00	236,40
	CASA ^{a*;b}	1.141	85,45(10,99)	12,86	35,8	119,60
	PELPT ^{a;b;c}	1.140	31,35(6,93)	22,10	8,40	61,70
	RCARPT ^{a;b;c}	1.139	13,21(1,15)	8,70	9,16	17,49
	SP ^{a;b;c}	1.146	168,84(26,65)	15,78	82,00	293,00
	GP35-41 ^{a;c}	1.144	482,78(105,92)	21,94	128,00	790,00
	PUL ^{a;c}	1.139	15,25(3,02)	19,80	7,40	24,60
	P21 ^{a;c*}	1.135	657,79(135,07)	20,53	256,00	1.034,00
	SCORE ^c	563	1.124(0,33)	0,03	1,00	2,00
	RCOR ^{c*}	1.129	0,56(0,07)	12,50	0,40	0,90
	RCASA ^{c*}	1.140	3,85(0,34)	8,83	2,60	5,54
	CARCX ^{c*}	1.138	132,49(20,82)	15,71	52,80	208,00
	RPFEM ^d	1.142	1,46(0,18)	12,33	0,98	2,29
PASA ^d	1.142	19,73(2,95)	14,95	10,00	31,80	
RASA ^d	1.133	7,52(0,42)	5,58	5,98	9,23	
PFEM ^d	1.143	19,73(2,95)	14,95	10,00	31,80	
SNP g.14.614A>G (TNFSF11)	GA ^{a*}	1.247	47,59(14,13)	29,70	2,50	94,00
	RGA ^{a*}	1.246	0,56(0,07)	12,50	0,40	0,91
	PNAS ^{a;b;c}	1.258	47,66(3,72)	7,80	37,40	61,80
	RCOR ^{a;b;c;d}	1.233	0,56(0,07)	12,50	0,40	0,91
	COR ^{a;b;c*;d}	1.234	12,42(2,16)	17,40	6,30	19,70
	RSP ^{b;d}	1.252	7,58(1,01)	13,32	3,88	11,31
	RCARPT ^{c*}	1.244	13,21(1,15)	8,71	9,16	17,50
	GP35-41 ^d	1.251	490,14(106,40)	21,71	158,00	802,00
	RPELPT ^d	1.244	1,41(0,25)	17,73	0,58	2,42

Características: consumo de ração dos 35-41 dias (CR35-41), rendimento de sangue e pena (RSP), rendimento de pele do peito (RPELPT), peso aos 41 dias (P41), peso aos 42 dias (P42), peso do fígado (FIG), rendimento de carcaça (RC), peso da asa (ASA), peso das coxas da asa (CASA), peso da pele do peito (PELPT), rendimento de carne do peito (RCARPT), peso de sangue e pena (SP), ganho de peso dos 35-41 dias (GP35-41), peso do pulmão (PUL), peso aos 21 dias (P21), curvatura do fêmur (SCORE), rendimento de coração (RCOR), rendimento das coxas da asa (RCASA), peso da carne da sobrecoxa (CARCX), rendimento de fêmures resfriados (RPFEM), peso da asa (PASA), rendimento de asa (RASA), peso do fêmur (PFEM), gordura abdominal (GA), rendimento de gordura abdominal (RGA), peso ao nascimento (PNAS), rendimento de sangue e pena (RSP), rendimento da pele do peito (RPELPT). Pesos medidos em gramas e rendimentos em %. a=efeito aditivo; b=efeito aditivo e de desvios de dominância; c=efeito aditivo dentro de sexo; d=efeito de desvios de dominância; * $P < 0,10$.

A mudança média causada em decorrência do efeito aditivo de substituição alélica do alelo A para o alelo G, influenciou de maneira significativa ($P < 0,05$) as características relacionadas ao desempenho (P21, GP35-41, P41, P42) de modo que a seleção do SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* à favor do alelo G resultaria em animais com melhores desempenhos fenotípicos para estas características. Park et al. (2006) identificaram uma região de QTL (“Quantitative trait loci”) associada à gordura abdominal em galinhas, em que o gene *TNFSF11* se encontra mapeado. Esses resultados corroboram com os obtidos neste trabalho por meio da associação do SNP g.14.614A>G (*TNFSF11*) com GA (Tabela 4), demonstrando que o gene *TNFSF11* pode ser utilizado como gene candidato na seleção para redução da gordura abdominal em frangos de corte.

Danyel et al. (2005) identificaram uma regiões de QTL associadas ao peso aos 49 dias de idade, gordura abdominal e percentagem de gordura abdominal, sendo que o gene *RUNX2* se encontra mapeado nessa região. No presente trabalho foi observada a associação do SNP g. 57.397A>G (*RUNX2*) com P42 (Tabela 4), indicando que o gene *RUNX2* pode ser utilizado como gene candidato no estudo desta característica. Contudo, deve-se ter cautela, pois a seleção deste SNP para características relacionadas ao desempenho, também poderia acarretar em aumento do consumo de ração e redução no rendimento de carcaça e carne do peito (Tabela 4).

O SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11* apresentou efeito aditivo de substituição alélica favorável para o alelo G. A seleção à favor deste alelo seria de grande importância tendo em vista que favoreceria a redução da deposição de gordura abdominal na carcaça dos animais (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados das análises de associação dos marcadores *RUNX2* e *TNFSF11* com características de desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea do fêmur considerando efeito aditivo (A) e respectivos erros-padrão (EP) em uma população paterna de frangos de corte

	Característica	A (EP)	LR
SNP g.57.397A>G (<i>RUNX2</i>)	P21	7,84 (3,59)	1,24**
	CR35-41	13,16(6,48)	4,10**
	GP35-41	9,16(4,12)	4,91**
	SP	2,90(1,12)	6,42**
	PELPT	0,77(0,31)	6,19**
	PUL	0,25(0,12)	4,05**
	RSP	0,09(0,04)	4,08**
	RPELPT	0,02(0,01)	3,66**
	RCARPT	-0,07(0,05)	45,18**
	P41	16,29(8,92)	3,37*
	P42	15,41(9,12)	2,90*
	FIG	0,74(0,40)	3,47*
	CASA	0,83(0,44)	3,59*
	RC	-0,15(0,07)	3,18*
	ASA	1,21(0,69)	3,11*
SNP g.14.614A>G (<i>TNFSF11</i>)	PNAS	0,45(0,16)	8,35**
	COR	-0,21(0,10)	4,86**
	RCOR	-0,01(0,004)	3,67**
	GA	-1,51(0,84)	3,16*
	RGA	-0,07(0,03)	3,64*

**P<0,05; *P<0,10; LR: Estatística do teste de razão de verossimilhança. Características: peso aos 21 dias (P21), consumo de ração dos 35 aos 41 dias (CR35-41), ganho de peso dos 35-41 dias (GP35-41), peso de sangue e penas (SP), peso da pele do peito (PELPT), peso do pulmão (PUL), rendimento de sangue e pena (RSP), rendimento da pele do peito (RPELPT), rendimento de carne do peito (RCARPT), peso aos 41 dias (P41), peso aos 42 dias (P42), peso do fígado (FIG), peso das coxas da asa (CASA), rendimento da carcaça resfriada (RC), peso da asa (ASA), peso ao nascimento (PNAS), peso do coração (COR), rendimento de coração (RCOR), gordura abdominal (GA) e rendimento de gordura abdominal (RGA). Pesos medidos em gramas, rendimentos em %.

Com relação aos efeitos aditivos e de desvios de dominância para substituição alélica do alelo A>G nos genes estudados, observa-se que a característica rendimento de sangue e penas (RSP) apresentou apenas efeito aditivo e de desvio de dominância (Tabela 5), ao contrário das demais características que apresentaram efeito aditivo significativo (P<0,05; Tabela 4). Esta característica é importantes no melhoramento de frangos tendo em vista que é mensurada durante o abate dos animais na composição de resíduos. A quantidade de sangue e penas pode

influenciar o aumento dos resíduos e conseqüentemente a redução do peso final de carne produzida.

Tabela 5. Resultados das análises de associação dos marcadores *RUNX2* e *TNFSF11* com características de desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea do fêmur considerando efeito aditivo (A) e de desvios de dominância (D) e respectivos erros-padrão (EP), e grau de dominância respectivo, em uma população paterna de frangos de corte

SNP/Gene	Característica	A (EP)	D (EP)	LR	Grau de dominância (d/a)
SNP g.57.397A>G (<i>RUNX2</i>)	SP	3,31(1,18)	1,73(1,48)	7,80	Parcial
	CASA	1,07(0,46)	0,98(0,57)	6,49	Parcial
	PELPT	0,80(0,32)	0,12(0,40)	6,28	Parcial
	ASA	1,60(0,73)	1,64(0,91)	6,29	Sobredominância
	RCARPT	-0,07(0,05)	-0,003(0,064)	45,20	Parcial
SNP g.14.614A>G (<i>TNFSF11</i>)	PNAS	0,70(0,23)	-0,45(0,30)	10,67	Parcial
	COR	-0,07(0,15)	-0,26(0,20)	7,30	Sobredominância
	RSP	-0,002(0,09)	0,12(0,11)	7,08	Parcial
	RCOR	-0,0001(0,006)	-0,01(0,008)	6,50	Sobredominância

P<0,05. LR: Estatística do teste de razão de verossimilhança. Características: peso de sangue e penas (SP), peso das coxas da asa (CASA), peso da pele do peito (PELPT), peso da asa (ASA), rendimento de carne do peito (RCARPT), peso ao nascimento (PNAS), peso do coração (COR), rendimento de sangue e penas (RSP), rendimento de coração (RCOR). Pesos medidos em gramas, rendimentos em %.

Características relacionadas ao desempenho do animal apresentaram efeito aditivo dentro sexo para substituição alélica de A>G nos genes *RUNX2* e *TNFSF11* (Tabela 6). Observa-se que machos são mais beneficiados pela substituição alélica de A>G em relação às fêmeas para as características de desempenho mensuradas na fase final de produção (GP35-41, CARCX). Contudo, as fêmeas possuem valores genéticos superiores aos machos para características de interesse econômico no início de seu ciclo de vida (PNAS e P21).

Tabela 6. Resultados das análises de associação dos marcadores *RUNX2* e *TNFSF11* com características de desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea do fêmur considerando efeito aditivo (A) dentro de sexo e de desvios de dominância (D) e respectivos erros-padrão (EP) em uma população paterna de frangos de corte

SNP/Gene	Característica	A (EP) Macho	A (EP) Fêmea	LR
SNP g.57.397A>G (<i>RUNX2</i>)	GP35-41	14,48(5,71)	4,72(5,28)	6,72**
	SP	3,77(1,4)	2,17(1,44)	7,06**
	PELPT	0,81(0,42)	0,73(0,39)	6,21**
	PUL	0,41(0,17)	0,12(0,15)	6,04**
	SCORE	0,08(0,03)	-0,02(0,03)	7,70**
	RCARPT	-0,10(0,06)	-0,05(0,06)	45,51**
	RCOR	0,0001(0,004)	-0,0091(0,0040)	5,26*
	RCASA	-0,02(0,02)	0,04(0,02)	5,62*
	P21	4,90(4,94)	10,31(4,59)	5,39*
	CARCX	2,31(0,99)	-0,19(0,92)	5,59*
SNP g.14.614A>G (<i>TNFSF11</i>)	PNAS	0,33(0,21)	0,58(0,22)	9,09**
	RCOR	-0,01(0,01)	-0,0004(0,0061)	6,80**
	COR	-0,29(0,14)	-0,11(0,15)	5,30*
	RCARPT	0,17(0,09)	-0,04(0,09)	4,70*

**P<0,05.*P<0,10. LR: Estatística do teste de razão de verossimilhança. Características: ganho de peso dos 35-41 dias (GP35-41), peso de sangue e penas (SP), peso da pele do peito (PELPT), peso do pulmão (PUL), curvatura do fêmur (SCORE), rendimento de carne do peito (RCARPT), rendimento de coração (RCOR), rendimento das coxas da asa (RCASA), peso aos 21 dias (P21), peso da carne da coxa (CARCX), peso ao nascimento (PNAS), rendimento de coração (RCOR), peso do coração (COR). Pesos medidos em gramas, rendimentos em %.

Ainda que os desvios de dominância sejam associações não lineares nas quais não ocorrem efeito de substituição alélica e sim interações alélicas independentes, o estudo da ação gênica não aditiva de dominância é importante pois constitui parte da expressão fenotípica de características com alta variância genética aditiva, podendo afetar a estimativa de herdabilidade das características (CRNOKRAK e ROFF, 1995). Características relacionadas ao desempenho dos animais apresentaram efeitos significativos (P<0,05) para efeito de desvios de dominância (Tabela 7).

As características relacionadas à integridade óssea do fêmur (PFEM e RPFEM) apresentaram efeito significativo (P<0,05) apenas para desvios de dominância com o SNP g.57.397A>G do gene *RUNX2* (Tabela 7). Contudo, a seleção utilizando este SNP em favor de PFEM e RPFEM não resultaria em mudanças quanto à integridade óssea do fêmur nesta população tendo em vista que os desvios de dominância são associações não lineares nas quais não ocorrem o efeito de substituição alélica A>G, mas ocorrem interações alélicas independentes.

Tabela 7. Resultados das análises de associação dos marcadores *RUNX2* e *TNFSF11* com características de desempenho, composição de carcaça, órgãos e integridade óssea do fêmur considerando efeito de desvios de dominância (D) e respectivo erros-padrão (EP) em uma população paterna de frangos de corte

SNP/Gene	Característica	D (EP)	LR
SNP g.57.397A>G (<i>RUNX2</i>)	RPFEM	0,02(0,01)	3,46
	PASA	0,25(0,14)	3,31
	RASA	0,04(0,02)	2,83
	PFEM	0,43(0,25)	2,78
SNP g.14.614A>G (<i>TNFSF11</i>)	COR	-0,32(0,14)	7,12
	RCOR	-0,01(0,005)	6,47
	RSP	0,12(0,08)	4,36
	GP35-41	-14,70(7,32)	4,04
	RPELPT	-0,04(0,02)	3,70

P<0,05. LR: Estatística do teste de razão de verossimilhança. Características: rendimento de fêmures resfriados (RPFEM), peso da ponta da asa (PASA), rendimento da asa (RASA), peso de fêmures resfriados (PFEM), peso do coração (COR), rendimento de coração (RCOR), rendimento de sangue e penas (RSP), ganho de peso dos 35-41 dias (GP35-41), rendimento da pele do peito (PELPT). Pesos medidos em gramas, rendimentos em %.

Os coeficientes de herdabilidade das características estudadas considerando os efeitos fixos de sexo, SNP e incubação variaram de 0,08 (RSP, RPELPT, RPCART, RCOR) à 0,90 (PNAS) (Tabela 8). Cruz (2013) estudando os genes da Apolipoproteína b e Receptor de Adiponectina 1 associados com características de desempenho na mesma população de frangos de corte, encontrou estimativas de herdabilidade inferiores às obtidas neste trabalho para GP35-41, PELPT, RPELPT. Peixoto et al. (2012) obtiveram estimativa de herdabilidade inferior para PNAS comparada à este trabalho (Tabela 8). Por meio destes resultados, podemos concluir que somente a característica PNAS associada ao SNP g.14.614A>G do gene *TNFSF11* possui componente genético aditivo de magnitude suficiente para responder ao processo de seleção.

Ainda que existam indícios da associação do SNP g.57.397A>G (*RUNX2*) com as características estudadas, principalmente com relação às características de desempenho, não é possível concluir que a seleção em favor deste marcador afetará essas características nesta população, tendo em vista que este a seleção para as características de desempenho não está alterando as frequências alélicas e genóticas deste SNP. Entretanto, ressalta-se a importância do estudo da arquitetura

genética dessa população a fim de identificar quais os mecanismos biológicos estão envolvidos nos processos de integridade óssea e desempenho do animal.

Tabela 8. SNP do gene, estimativas de herdabilidade (h^2) para as características em estudo com efeito significativo de substituição alélica, considerando os SNPs como efeitos fixos

SNP/Gene	Característica	h^2
SNP g.57.397A>G (<i>RUNX2</i>)	P21	0,15
	CR35-41	0,13
	GP35-41	0,12
	SP	0,14
	PELPT	0,22
	PUL	0,17
	RSP	0,08
	RPELPT	0,08
	RCARPT	0,08
SNP g.14.614A>G (<i>TNFSF11</i>)	PNAS	0,90
	COR	0,12
	RCOR	0,08

Características: peso aos 21 dias (P21), consumo de ração dos 35 aos 41 dias de idade (CR35-41), ganho de peso dos 35-41 dias (GP35-41), peso de sangue e penas (SP), peso da pele do peito (PELPT), peso do pulmão (PUL), rendimento de sangue e penas (RSP), rendimento de pele do peito (RPELPT), rendimento de carne do peito (RCARPT), peso ao nascimento (PNAS), peso do coração (COR), rendimento de coração (RCOR).

3.4 CONCLUSÃO

A seleção dos SNP g.57.397A>G (*RUNX2*) e g.14.614A>G (*TNFSF11*) para características associados à integridade óssea, não será eficiente quanto à diminuição dos problemas relacionadas às desordens ósseas na população estudada de frangos de corte. Contudo, o SNP g.14.614A>G (*TNFSF11*) pode ser utilizado no processo de seleção no intuito de reduzir a gordura abdominal e melhorar a qualidade da carcaça da população em estudo.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRNOKRAK, P.; ROFF, D. A. Dominance variance: associations with selection and fitness. **Heredity**, London, v. 75, n. 5, p. 530-540, 1995.

CRUZ, V. A. R. **Parâmetros genéticos e associação de caracteres de importância econômica com polimorfismos dos genes ADIPOR1 e APOB em frangos de corte**. 2013. 98 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2013.

CUNHA JUNIOR, A. **Procedimentos analíticos para determinação de minerais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. 22 p.

DANYEL, G. J.; ADDIE, L. J.; HENK, B.; RICHARD, M. P. A. Confirmation of quantitative trait loci affecting fatness in chickens. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 37, n. 3, p. 215-228, 2005.

DBSNP. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-polymorphic variants. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>>. Acesso em: 04 fev. 2015.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

GENETICS HOME REFERENCE. **Your guide to understanding genetic conditions**. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 out. 2013.

GORDON, D. C.; ABAJIAN; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

KAMMERER, M.; GUTZWILLER, S.; STAUFFER, D.; DELHON, I.; SELTENMEYER, Y.; FOURNIER, B. Estrogen Receptor α (ER α) and Estrogen Related Receptor α (ERR α) are both transcriptional regulators of the Runx2-I isoform. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 369 p. 150-160, 2013.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **Gene database**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 22 out. 2014.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D.; ALLEN, C.; BOUQUOT, J. **Oral and maxillofacial pathology**. Philadelphia: WB Saunders, 2002. p. 389-435.

NICKERSON, D. A.; TOBE, V. O.; TAYLOR, S. L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 14, p. 2745-2751, 1997.

OTTO, F.; KANEGANE, H.; MUNDLOS, S. Mutations in the *RUNX* gene in patients with cleidocranial dysplasia. **Human Mutation**, New York, v. 19, n. 3, p. 209-216, 2002.

PARK, H. B.; JACOBSSON, L.; WAHLBERG, P.; SIEGEL, P. B.; ANDERSSON, L. QTL analysis of body composition and metabolic traits in an intercross between chicken lines divergently selected for growth. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 25, n. 2, p. 216-223, 2006.

PEIXOTO, J. O.; COLDEBELLA, A.; JAENISCH, F. R. F.; TESSMANN, A. L.; RIBEIRO, J. B.; FORNARI, M. B.; MARCHESI, J. A. P.; NEIS, K. L.; FONGARO, G.; PERI, E. "Marcadores moleculares para características produtivas em frangos de corte." In: COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G. N. **Relatório de projetos concluídos 2011**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012. cap. 3, p. 43-52. (Documentos, 156).

PEREZ-ENCISO, M.; MISZTAL, I. QxPak: A versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 16, p. 2792-2798, 2004.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, Savoy, v. 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

RICHARDS, J. B.; KAVVOURA, F. K.; RIVADENEIRA, F.; STYRKARSDOTTIR, U.; ESTRADA, K.; HALLDORSSON, B. V.; SPECTOR, T. D. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 151, n. 8, p. 528-537, 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Cary, NC. 2001.1464 p.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; ZANATTO, A. C. S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 58, p. 25-40, 2000.

SEEDOR, J. G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 4, p. 265-270, 1995.

USUI, M.; XING, L.; DRISSI, H.; ZUSCIK, M.; O'KEEFE, R.; CHEN, D.; BOYCE, B. F. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing TNFSF11 in response to BMP2. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 23, n. 3, p. 314-325, 2008.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, 2003.