

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*).

Erika Cristina Jorge

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Erika Cristina Jorge

Bióloga

Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*).

Orientador:

Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba

2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Jorge, Erika Cristina

Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*) / Erika Cristina Jorge. - - Piracicaba, 2006.

151 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Embrião de animal 2. Fisiologia animal 3. Frangos 4. Tecido animal I. Título

CDD 636.5

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À Antônio V.O. Figueira,

Pelo carinho;

Pela compreensão

e atenção;

Pelo companheirismo;

Pela paciência;

e incentivo,

Com amor,

DEDICO

Agradecimentos

Agradeço o **Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho**, pela influência sobre a minha formação profissional, por todas as oportunidades que tive em seu laboratório, pela confiança em meu trabalho e pela amizade.

Agradeço o **Prof. Dr. Antônio V.O. Figueira**, por tantos motivos que não sou capaz de aqui todos indicar. Especialmente pela influência sobre a minha formação e crescimento profissional e pessoal, pelo companheirismo, amizade, carinho e amor. Agradeço por manter minha estabilidade e pela contribuição científica para a conclusão deste trabalho.

Gostaria de agradecer também ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, com a concessão das bolsas de doutoramento e de estágio de doutorado sanduíche (SWE), e com a aprovação de um auxílio, que foram fundamentais para dar suporte à minha formação profissional.

Agradeço a **Prof. Dra. Susanne Dietrich**, do departamento de Desenvolvimento Craniofacial do “King’s College London” (Londres, Reino Unido), pela orientação oferecida durante a realização do estágio sanduíche e pela oportunidade de fazer parte de seu brilhante grupo de pós-graduandos.

Agradeço eternamente a **Prof. Dra. Cláudia B. Monteiro-Vitorello**, porque foi com ela que aprendi a pensar em ciência, escrever e “clonar”; minha querida amiga.

Agradeço a **Prof. Dra. Lúcia E. Alvares**, que tem sido desde minha chegada a Piracicaba-SP, uma grande amiga e orientadora dos meus passos profissionais.

*Quero agradecer o **Prof. Dr. Cláudio M. R. Melo**, que na época do início deste trabalho estava como Pós-doutorando do laboratório e que hoje é professor da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis-SC). Assim como eu, trabalhou intensamente para tentar compreender a melhor forma de analisar esses dados de expressão em larga escala por microarranjos.*

*Quero agradecer a **Profa. Dra. Sônia Zingara e Rafael Fonseca Heck**, que foram os responsáveis pela construção dos microarranjos utilizados neste trabalho, pelo “Brazilian Clone Collection Center” (BCCC), localizada na UNESP de Jaboticabal, SP.*

*Agradeço ao amigo **Mateus Patrício**, pelo apoio em bioinformática para a realização das montagens e seleção dos clones a serem transferidos para os microarranjos.*

*Agradeço à amiga **Dra. Helena J. Alves, Marcelo de Lima Marchesin** e ao funcionário **Alexandre** do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, pela valiosa ajuda com as coletas dos tecidos de frango utilizados neste trabalho.*

*Agradeço ainda a **Dra. Sabrina Chabregas** (Copersucar, Piracicaba, SP) e **Carla Barsalobres**, que no início deste trabalho também estavam trabalhando com microarranjos (de cana-de-açúcar) e que me auxiliaram com os protocolos de hibridizações.*

*Gostaria de agradecer ao amigo **Millor F. Rosário**, hoje doutorando do laboratório, que me auxiliou com a localização dos transcritos diferencialmente expressos nos QTLs de frango e com discussão dos dados aqui apresentados.*

*Agradeço a minha querida amiga **Ana Paula Dini Andreote**, hoje estudante de iniciação científica do laboratório, que me auxiliou com a validação dos transcritos diferencialmente expressos entre as linhagens.*

*Agradeço de coração meu brilhante amigo **Mohi Ahmed**, meu orientador direto e “anjo da guarda” durante o estágio realizado em Londres, que me auxiliou com os embriões de frango, com os protocolos e com as aulas “grátis” de inglês!*

*Agradeço também aos amigos **Ingo Bothe**, “**Mia**” **von Scheven**, **Sheena Land** e **Sharon Pudaruth**, todos amigos do CFD10 do departamento de Desenvolvimento Craniofacial do “King’s College London”, que me auxiliaram e foram companheiros durante as horas e horas no microscópio...*

Também a todos os professores do departamento de Desenvolvimento Craniofacial do “King’s College London”.

*Agradeço a minha querida amiga **Valesca Pandolfi**, que me acompanhou durante todo este curso de doutoramento e que me deu suporte emocional para conseguir concluir este trabalho.*

Agradeço ao pessoal do laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” que contribuíram com a minha formação acadêmica

*Quero agradecer ainda às minhas queridas amigas, secretárias da Pós-graduação da ESALQ-USP, **Giovana**, **Creide**, **Vera** e **Cláudia**, pelo apoio burocrático e pela amizade. Também a todos os funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP.*

Agradeço imensamente aos meus queridos pais, irmãos, cunhadas e ao Lucas, o mais recente membro da família, pelo carinho, suporte emocional e paciência com as minhas constantes ausências.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 O melhoramento genético e a genômica	19
2.2 O genoma do frango	24
2.3 A detecção e a quantificação da expressão gênica por microarranjos	27
2.4 O material genético brasileiro	30
2.5 O desenvolvimento da musculatura esquelética	35
2.6 Orientadores de axônios e o desenvolvimento da musculatura esquelética	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Microarranjos de colônias bacterianas	47
3.1.1 Confecção e processamento das membranas	47
3.1.2 Sonda plasmidial para a normalização dos microarranjos	50
3.1.3 Obtenção e análise das imagens digitais	51
3.1.4 Material biológico e extração de RNA total para a síntese das sondas de cDNA	52
3.1.5 Síntese das sondas de cDNA para hibridização dos microarranjos	53
3.1.6 Hibridização dos microarranjos com sondas de cDNA	54
3.1.7 Análise estatística dos dados de expressão gênica	54
3.1.8 Análise de agrupamentos	56
3.1.9 Validação por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq)	56
3.2 Ensaio de hibridização <i>in situ</i> (HIS) para RGM-A	59
3.2.1 Clonagem da ORF de RGM-A	60
3.2.2 Síntese da sonda de RNA antisense para RGM-A	60
3.2.3 Coleta e preparação dos embriões para HIS	61

3.2.4 Hibridização <i>in situ</i>	62
3.2.5 Foto-microscopia	63
3.2.6 Cortes transversais	63
3.3 Eletroporação <i>in ovo</i>	64
3.3.1 Sub-clonagem de RGM-A em pCA β	64
3.3.2 Eletroporação	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 A seleção dos transcritos para a construção do microarranjo	67
4.2 Resultados da hibridização com a sonda plasmidial e correção para a quantidade de DNA impressa nos microarranjos	68
4.3 As estatísticas de desempenho dos microarranjos	69
4.4 Identificação de transcritos diferencialmente expressos na musculatura peitoral entre linhagens de frango selecionadas para corte e postura	72
4.4.1. Validação dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frango por RT-PCR quantitativo	80
4.4.2 Validação <i>in silico</i> dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frango com potenciais diferentes de crescimento	81
4.5 Análise do padrão de expressão dos 4.534 transcritos identificados por seqüenciamento de ESTs entre cinco tecidos de <i>Gallus gallus</i>	90
4.5.1 Transcritos diferencialmente expressos entre os tecidos amostrados	91
4.5.2 Transcritos preferencialmente expressos	92
4.5.3 Transcritos tecido-específicos	94
4.5.4 Validação da indicação dos transcritos diferencialmente expressos entre os tecidos de frango por RT-PCRq	96
4.5.5 Análise de agrupamentos	98
4.6 Análise do padrão de expressão de RGM-A em embriões de frango	102
5 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	114

RESUMO

Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*).

Os grandes avanços obtidos em quantidade de massa muscular nos animais domésticos foram alcançados por programas de melhoramento genético baseados na seleção de características fenotípicas observados na fase adulta do animal. No entanto, o número de precursores miogênicos e conseqüentemente, de fibras musculares, é determinado nos estádios embrionários do desenvolvimento. Este fato direcionou o programa miogênico como alvo de busca de potenciais transcritos candidatos que possam causar impacto sobre a deposição muscular em animais domésticos. Este trabalho objetivou identificar transcritos candidatos originais associados ao desenvolvimento e crescimento do tecido muscular esquelético em frangos (*Gallus gallus*). Um total de 4.534 transcritos (ESTs) identificados em trabalhos anteriores foram imobilizados em membrana de náilon (microarranjo) para permitir a investigação das diferenças no padrão de expressão entre genótipos e tecidos. O perfil transcricional do tecido muscular peitoral entre linhagens contrastantes para potencial de crescimento e deposição muscular da Embrapa Suíno Aves permitiu identificar 98 transcritos diferencialmente expressos, que foram validados por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-PCRq), e localizados em regiões coincidentes às anteriormente mapeadas por QTLs. Estes transcritos são agora os candidatos preferenciais para a identificação de mutações e desenvolvimento de marcadores específicos que possam ser empregados em programas de melhoramento e seleção precoce ou indireta de aves. O mesmo microarranjo foi utilizado para caracterizar os transcritos desconhecidos pelo padrão de expressão entre cinco tecidos (cérebro, coração, fígado, músculo e pele). Esta abordagem permitiu identificar transcritos com padrão de expressão tecido-específico e tecido-preferencialmente expressos e caracterizar 24 transcritos desconhecidos como co-expressos aos transcritos músculo esquelético-específicos. Por fim, o orientador de axônio RGM-A (*Repulsive guidance molecule A*), identificado como músculo esquelético-específico, foi selecionado para ser funcionalmente analisado *in vivo*, para investigar uma possível função deste transcrito atípico no tecido muscular e comprovar a eficiência dos microarranjos em orientar a seleção de transcritos candidatos. O padrão de expressão de RGM-A em embriões de frango e os efeitos da super-expressão sobre Pax3 indicaram uma possível associação deste orientador de axônio com a formação da musculatura esquelética dos vertebrados superiores. Os transcritos candidatos indicados por análises de microarranjo deste trabalho serão úteis não apenas para que os programas de melhoramento sejam capazes de manter ou aumentar os índices de crescimento das aves, que atualmente buscam por informações adicionais para superar os limites impostos pelo próprio perfil genético alcançado em anos de seleção. Estes resultados também abriram novas perspectivas para a caracterização funcional *in vivo* de transcritos desconhecidos, tendo embriões de frango como modelo animal.

Palavras-chave: Desenvolvimento muscular; Deposição muscular; Microarranjos; *Gallus gallus*; Transcritos candidatos; Embriões; RGM-A

ABSTRACT

Identification and characterization of transcripts associated with skeletal muscle development and growth in chicken (*Gallus gallus*).

A large improvement in skeletal muscle mass quantity in domestic animals was achieved by animal breeding programs along the years based on the observation of adult phenotypic characters. But, the number of myogenic precursor cells and, consequently, the number of muscle fibers is determined during the embryonic stages of development. Therefore, the embryonic myogenic program is an ideal target for searching potential candidate-transcripts, that can influence skeletal muscle deposition in domestic animals. This work aimed to identify original candidate-transcripts associated with skeletal muscle development and growth in chicken embryos (*Gallus gallus*). A total of previously identified 4,534 transcripts (Expressed Sequence Tags) were transferred to a nylon membrane (microarray) to investigate differences in expression patterns among genotypes and tissues. The pectoral skeletal muscle transcriptional pattern between broiler and layer chicken lines allowed the identification of 98 differentially expressed transcripts, whose expression were validated by quantitative RT-PCR (Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction), and were co-localized in coincident regions with previously mapped QTLs (Quantitative Trait Loci). These transcripts are now preferential candidates to further identify mutations, and/or to develop specific markers to be used in breeding programs for early or indirect selection of superior animals. The same microarray was used to characterize unknown transcripts by expression patterns among five tissues (brain, heart, liver, muscle and skin). This approach allowed to identify tissue-specific and/or preferentially-expressed transcripts, and to characterize 24 unknown transcripts as co-expressed with skeletal muscle-specific ones. Finally, the axon guidance molecule RGM-A, identified as skeletal muscle-specific transcript by microarrays, was selected to be functionally analyzed *in vivo*, to investigate the function of this atypical transcript in the skeletal muscle and to demonstrate the approach efficiency to guide selection of candidate transcripts. The RGM-A expression pattern and the Pax3 phenotype after over-expression in chicken embryos indicated a possible association of this axon guidance with the skeletal muscle formation. The candidate transcripts identified by microarray analyses may be useful in animal breeding programs to increase the present gains in chicken growth rate, since additional information is urgently required to surpass current limits of selection gains. The results have also opened a new range of possibilities to promote the functional characterization *in vivo* of unknown transcripts, having chicken embryos as models.

Keywords: Muscle development; Muscle deposition; Microarrays; *Gallus gallus*; Candidate transcripts; Embryos; RGM-A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo dos somitos em dermomiótomo dorsal, esclerótomo ventral e miótomo intermediário	38
Figura 2 -	Esquema representativo da membrana utilizada para a construção dos microarranjos	48
Figura 3 -	Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na síntese da sonda a partir do método <i>overgo</i>	50
Figura 4 -	Microarranjo hibridizado com a sonda plasmidial para a determinação da quantidade de DNA impressa nas membranas	69
Figura 5 -	Intensidade de sinal [em escala logarítmica na base 2 (\log_2)] de repetições das sondas de cDNA	70
Figura 6 -	Poder de teste	71
Figura 7 -	Gráfico gerado pela análise de agrupamento realizada pelo programa <i>Genespring</i>	99
Figura 8 -	Resultado obtido pelo programa <i>Genespring</i> após buscas por transcritos desconhecidos com padrão de expressão similar ao obtido para transcritos mais expressos na “musculatura esquelética”	99
Figura 9 -	Padrão de expressão de RGM-A entre os estádios HH3 e HH10 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) do desenvolvimento embrionário de <i>Gallus gallus</i>	108

Figura 10 - Padrão de expressão de RGM-A em embriões de <i>Gallus gallus</i> nos estádios HH20, HH21, HH24 e HH25 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951)	109
Figura 11 – Padrão de expressão de RGM-A em cortes transversais em nível torácico de embriões nos estádios HH8, HH9, HH10 e HH16 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951)	109
Figura 12 – Visão lateral (acima) e cortes transversais (abaixo) do padrão de expressão para RGM-A nos somitos de embriões de <i>Gallus gallus</i> nos estádios HH20 e HH21	110
Figura 13 – Embriões transformados por eletroporação com a construção de expressão pCA β -RGM-A e efeitos sobre os marcadores BMP1b, Myf5, EphA4 e Pax3	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos pares de iniciadores utilizados nas reações de RT-PCRq para a validação dos genes diferencialmente expressos por ensaios de microarranjos	57
Tabela 2 – Condições estabelecidas para a amplificação dos transcritos por RT-PCR quantitativo	59
Tabela 3 – Transcritos identificados com maior expressão na musculatura esquelética peitoral de frangos da linhagem selecionada para corte, juntamente com os nomes dos clones, para a localização dos transcritos nas bibliotecas de cDNA, e números LOC, para a localização dos transcritos no banco <i>Gene</i> do NCBI	77
Tabela 4 – Transcritos identificados com maior expressão na musculatura esquelética peitoral de frangos da linhagem selecionada para postura de ovos, juntamente com os nomes dos clones, para a localização dos transcritos nas bibliotecas de cDNA, e números LOC, para a localização dos transcritos no banco <i>Gene</i> do NCBI	79
Tabela 5 - Médias e desvios padrão da expressão dos transcritos diferencialmente expressos descritas em unidades Ct e o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação das diferenças em expressão entre as linhagens	81
Tabela 6 – Validação <i>in silico</i> dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na linhagem de corte (TT) e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves	85

Tabela 7 – Validação <i>in silico</i> dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na linhagem de postura (CC) e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves	88
Tabela 8 - Número de genes diferencialmente expressos entre “coração”, “fígado”, “cérebro”, “pele” e “musculatura esquelética” (P <0,05)	92
Tabela 9 - Transcritos tecido-preferencialmente expressos identificados por microarranjos	93
Tabela 10 - Transcritos tecido-específicos identificados nos microarranjos, números LOC identificadores no NCBI e função biológica correspondente	94
Tabela 11 - Médias e desvios padrão da expressão dos transcritos diferencialmente expressos descritas em unidades Ct e o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação das diferenças em expressão entre as linhagens	97
Tabela 12 - Transcritos desconhecidos identificados com padrão de expressão similar aos mais expressos na “musculatura esquelética”	100

1 INTRODUÇÃO

Os avanços obtidos em quantidade de massa muscular nos animais domésticos foram alcançados por programas de melhoramento genético baseados na seleção dos caracteres fenotípicos observados nas fases adultas do animal. De fato, estes programas atingiram índices significativos de produtividade de carne, mesmo sem considerar as bases moleculares envolvidas com o processo miogênico (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; ANDERSSON; GEORGE, 2004). Entretanto, os estudos dos mecanismos moleculares responsáveis pela formação e crescimento da musculatura esquelética revelaram que o número de células precursoras que irão expressar genes músculo-específicos no indivíduo adulto é determinado nos estádios embrionários do desenvolvimento (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002). Grande parte do crescimento muscular que ocorre após o nascimento ou eclosão é devido ao aumento em volume das fibras musculares, por hipertrofia muscular (MOSS, 1968). Este fato direcionou o programa miogênico como alvo de busca de potenciais transcritos candidatos que possam causar impacto sobre a deposição muscular em animais domésticos.

Os transcritos candidatos podem ser identificados ou pelo mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs), ou pela seleção direta com base em conhecimentos de fisiologia e bioquímica, ou ainda pela identificação de transcritos diferencialmente expressos. Mesmo permitindo a identificação de transcritos associados aos fenótipos de interesse, é reconhecido que cada uma destas estratégias apresente suas limitações. O mapeamento de QTLs, por exemplo, permite determinar as regiões cromossômicas que contém os genes de interesse, mas o intervalo de confiança de localização pode conter milhares de pares de bases e incluir inúmeros genes. O número de transcritos conhecidos envolvidos com o processo biológico de interesse também pode ser limitante, e entre os transcritos diferencialmente expressos podem ser identificadas vias metabólicas associadas à característica de interesse, mas não o transcrito responsável. Para que os transcritos identificados possam ser utilizados em programas de seleção de animais para o melhoramento, eles devem ainda permitir a identificação de mutações que possam explicar ou estar associadas aos genes responsáveis pela variabilidade fenotípica observada na população. Marcadores moleculares devem permitir a identificação e a genotipagem dessas mutações em uma população referência e, caso confirmada a associação

entre os genótipos e o fenótipo de interesse, também permitir a identificação das mutações nas populações comerciais.

No Brasil, populações referência de frangos (*Gallus gallus*) foram desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves, contrastantes para características zootécnicas distintas, incluindo para o potencial de deposição muscular e crescimento. Estas populações derivadas de cruzamentos entre linhagens de corte (TT) e postura (CC) vêm sendo utilizadas pelo laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP para o mapeamento de QTLs, para a genotipagem por marcadores moleculares derivados de mutações identificadas em transcritos de função reconhecida no programa miogênico e para a identificação de transcritos candidatos originais, possivelmente associados ao potencial muscular de aves. O objetivo é gerar marcadores moleculares que permitam a avaliação precoce ou indireta do potencial muscular de frangos nos estádios embrionários do desenvolvimento, ou que possam ser manipulados *in vivo* para a obtenção de transgênicos superiores.

O presente trabalho objetivou identificar transcritos candidatos originais associados ao desenvolvimento e crescimento do tecido muscular esquelético. Estes transcritos têm sido investigados em trabalhos anteriores, quando os precursores miogênicos (somitos) e amostras de musculatura peitoral de frangos destas linhagens da Embrapa, em estádios distintos do desenvolvimento, foram utilizadas para a obtenção de etiquetas de seqüências expressas (*expressed sequence tags*, ESTs). Foram identificados no tecido alvo, 6.744 possíveis transcritos, dos quais cerca de 40% não dispunham de função presumível disponível, baseada em similaridade com bancos de dados públicos. Deste total de transcritos, 4.534 foram imobilizados em membrana de náilon (microarranjo) para permitir a investigação das diferenças no padrão de expressão entre genótipos ou tecidos.

Primeiramente, o microarranjo foi utilizado para comparar o perfil transcricional do tecido muscular peitoral entre as linhagens contrastantes para potencial de crescimento e deposição muscular da Embrapa, buscando transcritos candidatos relacionados às diferenças fenotípicas. Considerando que a deposição muscular deriva da sinalização à fatores de crescimento e hormônios para a ativação de genes músculo-específicos no momento e local apropriados, era esperado que entre esses candidatos diferencialmente expressos estivessem listados transcritos associados à essas categorias funcionais.

Em seguida, o mesmo microarranjo foi utilizado para caracterizar os transcritos desconhecidos (hipotéticos; não-annotados; ou anotação atípica ou bizarra) pelo padrão de expressão entre cinco tecidos (cérebro, coração, fígado, músculo e pele). Como a transcrição coordenada de genes funcionalmente relacionados pode ser observada em pelo menos metade dos processos celulares (EISEN et al., 1998; NIEHRS; POLLET, 1999), o reconhecimento de padrões similares ou tecido-específico de expressão dos transcritos poderia sugerir funções relacionadas.

Como comprovação desse conceito, um dos transcritos identificados com padrão músculo esquelético-específico, mas com função presumível bizarra, foi selecionado para ser funcionalmente investigado *in vivo*. O transcrito apresentava anotação como um orientador da formação de axônios, conhecido como *repulsive guidance molecule A* (RGM-A), anteriormente descrito com funções no fechamento do tubo neural (NIEDERKOFER et al., 2004). Em colaboração com o grupo da Dra. Susanne Dietrich, do departamento de Desenvolvimento Craniofacial do *King's College London* (Londres, Reino Unido), foi possível iniciar as investigações funcionais desse RGM-A em embriões de frango por hibridização *in situ* e super-expressão, buscando comprovar a indicação do microarranjo e investigar um possível papel biológico para este orientador de axônio no tecido muscular esquelético.

A abordagem adotada neste estudo permitiu indicar 98 transcritos como diferencialmente expressos entre as linhagens, que foram validados por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-PCRq) e localizados em regiões coincidentes às anteriormente mapeadas por QTLs. Estes transcritos são agora os candidatos preferenciais para a identificação de mutações e desenvolvimento de marcadores específicos que possam ser empregados em programas de melhoramento e seleção de aves. A abordagem permitiu ainda identificar transcritos com padrão de expressão músculo-específico ou preferencialmente expressos e, a partir deles, caracterizar 24 transcritos desconhecidos como co-expressos. Por fim, o padrão de expressão de RGM-A em embriões de frango indicou uma possível associação deste orientador de axônio com a formação da musculatura esquelética dos vertebrados superiores. Estes transcritos candidatos serão úteis não apenas para que os programas de melhoramento sejam capazes de manter ou aumentar os índices de crescimento das aves, que atualmente buscam por informações adicionais para superar os limites impostos pelo próprio perfil genético alcançado em anos de seleção. Estes resultados também abriram novas perspectivas para a caracterização

funcional *in vivo* de transcritos desconhecidos, tendo embriões de frango como modelo animal. Entre os animais domésticos, os embriões de frangos têm sido considerados os mais apropriados para pesquisas em embriologia, porque o desenvolvimento é morfológicamente similar ao dos mamíferos; são embriões acessíveis para serem manipulados, uma vez que o desenvolvimento ocorre *in ovo* ao invés de *in utero*; e são considerados modelos para estudos clássicos de desenvolvimento de vertebrados e determinação de função biológica de genes. Também são modelos para estudos de doenças genéticas humanas (como distrofias, epilepsia e diminuição de respostas imunológicas) e para a compreensão dos mecanismos envolvidos e da base genética da suscetibilidade a infecções virais (SCHMUTZ; GRIMWOOD, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O melhoramento genético e a genômica

O genoma das espécies de interesse econômico vem sofrendo alterações desde o início do processo de domesticação das congêneres selvagens. Por alterar a composição genética para uma maior produtividade e adaptação às necessidades do produtor e do consumidor, a domesticação representou o primeiro evento de estreitamento da diversidade genética dessas espécies (GEPTS, 2003).

Foi sobre este conjunto de alelos, já alterados das espécies selvagens, que se fundamentou o melhoramento genético das raças domésticas. Com base em caracteres fenotípicos, indivíduos considerados superiores foram sendo selecionados como genitores para as próximas gerações, inicialmente intuitivamente, e posteriormente com base em conhecimentos genéticos, num processo denominado de melhoramento genético tradicional. Anos de seleção seguindo esses parâmetros levaram ao aumento da frequência de alelos favoráveis nas populações. Estes programas de melhoramento atingiram índices significativos de produtividade, além de um alto potencial adaptativo para essas espécies, sem mesmo conhecer os genes e os mecanismos moleculares associados (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; ANDERSSON; GEORGE, 2004).

O peso ao abate de frangos de corte pode ser utilizado como exemplo dos ganhos obtidos com o emprego das técnicas de melhoramento tradicionais (COUTINHO; REGITANO, 2001). Em 1968, eram necessários 72 dias para um frango de corte atingir o peso de abate (de aproximadamente 2kg), com conversão alimentar de 2,38. Anos de seleção reduziram este tempo, sendo que em 1994 eram necessários apenas 42 dias para se atingir um peso de 1,99kg, com conversão de 1,77. A quantidade de gordura subcutânea do lombo de suínos e a produção de leite em bovinos são outros entre os inúmeros exemplos de características que foram substancialmente influenciadas pelo melhoramento tradicional (COUTINHO; REGITANO, 2001).

Apesar dos ganhos observados, a previsão do potencial genético com base no fenótipo do animal não tem sido eficiente para um grande número de características de interesse econômico. Como prever, por exemplo, o potencial de produção de leite em um touro? Ou o potencial de produção de ovos de um galo? Rendimento de carcaça e de partes, quantidade de

gordura corporal e resistência a doenças metabólicas são outros exemplos de características difíceis de serem utilizadas em programas de melhoramento tradicional.

O desenvolvimento dos marcadores moleculares a partir de Botstein e colaboradores (1980) abriram novas perspectivas para o melhoramento genético. Marcas na seqüência de DNA próximas à região de interesse (genes) permitiriam o acompanhamento da segregação de alelos por gerações e por conseqüência, da característica associada. Estas marcas são identificadas pela associação dos alelos segregantes com valores fenotípicos referentes à característica estudada (LIU, 1998). Como a capacidade de produção de um animal (fenótipo) é resultado da interação entre o material genético (genótipo) e o ambiente, estes marcadores representariam a possibilidade de seleção de indivíduos com base no genótipo, antes mesmo da expressão do fenótipo. Vislumbrou-se, portanto, a possibilidade de determinação do potencial genético de um animal nos estádios embrionários ou jovens, sem a necessidade de avaliação da produção ou da progênie, o que levaria a uma seleção mais rápida e eficiente de indivíduos superiores (COUTINHO; REGITANO, 2001).

Exemplos de aplicação desses marcadores para o melhoramento são muitos. Foi assim, por exemplo, que foi desenvolvido o teste molecular para a detecção da síndrome da hipertermia em suínos (MHS). Uma mutação recessiva no gene do receptor de rianodina (RYR1) foi identificada e associada a uma redução na qualidade da carne de suínos (FUJII et al., 1991). Um teste genético simples foi desenvolvido para detectar esta mutação e é hoje empregado em programas de melhoramento genético de suínos, o que facilitou a identificação de animais portadores nas populações, sem a necessidade de testes fenotípicos do Halotano (HARLIZIUS; WIJK; MERKS, 2004). O fenótipo de musculatura dupla observado em bovinos das raças *Belgian Blue* e *Piedmontese* também teve a base genética explorada, levando à identificação de várias mutações no gene da miostatina (ou fator de diferenciação do crescimento 8, membro da superfamília TGF- β) (GROBET et al., 1997; McPHERRON; LEE, 1997). Essas mutações resultam em proteínas não-funcionais que levam a um aumento significativo da massa muscular do animal (~30%), do peso ao nascimento e na eficiência alimentar, e esse aumento da massa muscular deriva principalmente de efeito de hiperplasia (aumento no número de fibras). Entretanto, este fenótipo também apresenta problemas de diminuição da quantidade de gordura intramuscular, da fertilidade das fêmeas e da tolerância ao estresse (POTTS et al., 2003) e não há interesse em fixar esses alelos nas populações. Marcadores moleculares podem ser utilizados para

identificar a heterogeneidade genética associada a essa característica, permitindo a identificação direta das mutações na população por genotipagem. A obtenção prévia do genótipo dos indivíduos poderia orientar acasalamentos e transferências de embriões, por exemplo.

Os marcadores moleculares representaram uma ferramenta poderosa para a identificação das mutações que influenciam características monogênicas em populações alvo. Inúmeras mutações em características como essas foram identificadas, estando a maioria listada na base de dados OMIA (*online Mendelian inheritance in animals*, OMIA). No entanto, a maioria das características de interesse econômico apresenta o padrão poligênico de herança, sendo determinadas por inúmeros genes com pequenos efeitos individuais e sob influência de fatores ambientais. A prospecção dos alelos associados a essas características complexas nas populações somente foi possível a partir da identificação de diversos marcadores moleculares altamente polimórficos no genoma, principalmente os microssatélites (TAUTZ, 1989), permitindo a construção de mapas genéticos densos para as espécies de interesse.

Paterson e colaboradores (1990) foram os primeiros a demonstrar em estudos pioneiros com tomateiro que os genes com efeitos sobre características complexas poderiam ser identificados por estudos de ligação em larga-escala com marcadores moleculares. Revelaram que o mapeamento genético utilizando marcadores altamente polimórficos em famílias segregantes (ou em desequilíbrio de ligação) permitia a associação de uma região cromossômica com a característica de interesse. Estas regiões cromossômicas ficaram conhecidas como *loci* de características quantitativas (QTLs, da sigla em inglês para *quantitative trait loci*). A partir destes estudos foram desenvolvidos inúmeros mapas genéticos e o mapeamento de QTLs para a diversas características de interesse econômico em populações experimentais desenvolvidas para espécies domésticas (ANDERSSON, 2001; HARLIZIUS; WIJK; MERKS, 2004).

Os mapas de ligação para o genoma do frango já incluem 2.172 *loci* genéticos, com uma cobertura total próxima a 4.000 cM (HILLIER et al., 2004). QTLs foram mapeados ao longo do genoma para as principais características de produção, comportamento e resistência à doenças para populações diferentes (recentemente revisado por HOCKING, 2005).

Para citar apenas o cromossomo 4, cerca de 15 QTLs já foram mapeados, incluindo características como rendimento de carcaça (um QTL), peso corporal (cinco QTLs), resistência à doenças (dois QTLs) e peso dos ovos (três QTLs), entre outros (HOCKING, 2005). Mas estes QTLs apresentaram uma distribuição aleatória ao longo do cromossomo, o que

significa que poucos QTLs mapeados para uma mesma característica foram co-localizados em regiões coincidentes no genoma. No cromossomo 4, apenas uma região próxima a 207-208 cM foi associada às características de peso corporal (KAAM et al., 1998; SEWALEM et al., 2002; TUISKULA-HAAVISTO et al., 2002) e consumo de ração (KAAM et al., 1998; TUISKULA-HAAVISTO et al., 2002) por estudos independentes. Interessantemente, estes QTLs foram ainda confirmados em uma população comercial de frangos de corte (DE KONING et al., 2003). Mas são poucos os casos como estes observados para o genoma do frango, de QTLs mapeados em regiões coincidentes em estudos distintos e, principalmente, com validação em populações comerciais (HOCKING, 2005).

Apesar do mapeamento representar um importante passo na análise de características poligênicas e ser fundamental na análise do genoma, o potencial de emprego direto dos QTLs mapeados na seleção assistida por marcadores (MAS, do inglês, *marker assisted selection*) ainda não foi completamente revelado. Para que isto fosse possível, seria necessário transformar esses QTLs em unidades de segregação Mendeliana, a partir da identificação das mutações nos genes presentes na região cromossômica que influenciam os QTLs. Alguns resultados recentes provam que esta estratégia é possível. Em bovinos, por exemplo, as bases moleculares associadas a dois QTLs que influenciam produção e composição do leite foram reveladas explorando o desequilíbrio de ligação de uma mutação no gene de diacilglicerol O-acetiltransferase (DGAT1) (GRISART et al., 2002) e outra no gene do receptor para hormônio de crescimento (BLOTT et al., 2003). Em suínos, QTLs que influenciam massa muscular e composição de gordura corporal foram identificados próximos ao *locus* para IGF2 (JEON et al., 1999; NEZER et al., 1999) e uma mutação simples foi identificada pelo re-seqüenciamento de um fragmento de 30 kb (VAN LAERE et al., 2003).

Mas, resultados como estes ainda são raros porque há grandes limitações para a identificação da base genética de um QTL. Primeiro, porque a localização do QTL no cromossomo não é precisa. Por serem determinados estatisticamente, esta precisão na localização dos QTLs é dependente da geração de um grande número de genótipos e fenótipos na população de estudo, além da redução do efeito ambiental. Sem precisão, fica difícil estabelecer o tamanho do fragmento contendo o QTL para a clonagem e a identificação das mutações que determinam os efeitos observados. Em segundo lugar, estes QTLs são mapeados em populações desenvolvidas experimentalmente, sob um determinado desequilíbrio de ligação. Isto impede a

transferência direta da informação obtida nas populações experimentais para as populações comerciais, exigindo um passo de validação do QTL (ANDERSSON, 2001; HARLIZIUS; WIJK; MERKS, 2004).

O quadro é ainda mais complexo porque o conhecimento básico sobre os mecanismos biológicos que controlam as características de interesse econômico é incompleto. Características como crescimento, por exemplo, envolvem efeitos aditivos e epistáticos entre QTLs (HOCKING, 2005). QTLs mapeados para crescimento em frangos, por exemplo, revelaram que mecanismos genéticos distintos controlam as fases embrionária e adulta do crescimento do animal e, por isso, esta característica deve ser influenciada por inúmeros genes, mas poucos de efeitos grandes e com efeitos aditivos sobre a deposição de massa muscular (CARLBORG et al., 2003).

No caso da avicultura, alguns cálculos já permitem prever que, com o atual perfil genético alcançado pelos animais, serão necessários 20 anos para se atingir os limites do melhoramento genético para algumas características (BURT, 2002). A continuidade desses programas poderia ser beneficiada com esquemas de introgressão genética. Nestes esquemas, novos alelos seriam introduzidos nas populações por meio de cruzamentos das linhagens atuais com espécies selvagens ou *landraces*, que ainda detém o conjunto de alelos inalterado por seleção. Nesse uso reside uma das importâncias da conservação dos recursos genéticos para a agricultura. Entretanto os perfis genéticos de diversas espécies selvagens e *landraces* não foram devidamente determinados e muitas delas já não existem mais, limitando a aplicabilidade desse processo.

A biologia molecular com enfoque no DNA contribuiu para o desenvolvimento de métodos, como os marcadores moleculares e o mapeamento de QTLs, que foram incorporadas aos programas de melhoramento genético com finalidade de auxiliar na seleção de indivíduos superiores de forma mais eficiente. A estratégia tem funcionado para algumas características, mas demonstrou limitações, especialmente para a análise das características econômicas mais interessantes – as poligênicas. Mas, o DNA não é o único material genético da célula que pode ser analisado e utilizado para gerar informações de genes candidatos envolvidos com as características de interesse para a agricultura.

Uma pequena amostra de um tecido é suficiente para revelar o seu conteúdo de RNA mensageiro (RNAm) característico. Esta população de RNAm corresponde ao conjunto dos

genes expressos naquele tecido, em função de uma determinada condição biológica, tratamento ou fase do desenvolvimento. Portanto, a transferência do foco da análise molecular para a população de RNAm permitiria a identificação de genes candidatos diretamente no tecido-alvo. A comparação entre perfis transcricionais contrastantes (genótipos, condições fisiológicas ou ontológicas diversas) também poderia revelar os genes responsáveis pelo processo biológico em estudo (CALSA JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004). Foi assim que surgiu o interesse por métodos de identificação das etiquetas de seqüências expressas (as ESTs, do inglês *expressed sequence tags*) (ADAMS et al., 1991, detalhado por HATEY et al., 1998); e de detecção e caracterização de genes diferencialmente expressos, em combinação com a técnica da PCR, como *differential display* (DDRT) (LIANG; PARDEE, 1992), cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1996); TOGA (*Total Gene Expression Analysis*; SUTCLIFFE et al., 2000); e *GeneCalling* (SHIMKETS et al., 1999) (CALSA JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA 2004).

ESTs são ferramentas indispensáveis para a identificação de genes e para a anotação do mapeamento físico do genoma (BROWN et al., 2003). Mais de 588.000 EST para *Gallus gallus* encontram-se depositadas no banco público de seqüências (NCBI, acesso em abril de 2006). Abdrakhmanov e colaboradores (2000) foram os primeiros pesquisadores a gerar ESTs para frangos, escolhendo a bursa como tecido-alvo, devido a sua importância para a geração das linhagens de células B e DT40. ESTs foram obtidas para a inúmeros tecidos e estádios do desenvolvimento de frango, sendo que a maior contribuição (de mais de 340.000 ESTs) foi do *Biotechnology and Biological Sciences Research Council* (BBSRC) (BOARDMAN et al., 2002). Esta coleção de ESTs forneceu evidências para a identificação de 18.989 genes no genoma e 19.626 cDNA completos no banco, que são essenciais para a anotação do genoma e fonte valiosa para experimentadores interessados em função gênica (HUBBARD et al., 2005).

2.2 O genoma do frango

Gallus gallus têm sido extensivamente usados como organismo-modelo para estudos de diversos aspectos e sistemas biológicos por várias razões. As aves fazem a ponte evolucionária entre mamíferos e outros vertebrados. Além disso, os frangos são o principal representante de aproximadamente 9.600 espécies de aves (HILLIER et al., 2004). São, portanto, organismos chave para a compreensão de aspectos evolutivos e de diversidade genética entre

espécies. Foram domesticados na Ásia há pelo menos 5.400 anos A.C. (LIU et al., 2006) e *red jungle fowl* foi descrito como o ancestral mais próximo das aves domésticas. Anos de seleção fizeram com que se tornassem modelos excelentes para a compreensão das bases genéticas de características fenotípicas, porque apresentam uma extensiva diversidade entre as espécies domesticadas, que foram selecionadas com propósitos diferentes. As células B e os vírus que causam tumores foram descobertos em estudos com frangos (BROWN et al., 2003) e os embriões são considerados um sistema ideal para estudos de biologia do desenvolvimento. Isto porque são fáceis de serem incubados e manipulados, uma vez que o desenvolvimento ocorre *in ovo* e não *in utero*.

Por sua importância biológica e econômica, *Gallus gallus* foi a primeira espécie doméstica a ter a sequência do genoma determinada: em 2004 foi publicado o primeiro rascunho do genoma frango (HILLIER et al., 2004). Esta foi uma iniciativa conjunta de vários grupos, que incluem a Universidade de Washington (St. Louis, MO, EUA) e o *Roslin Institute* (Edinburgh, Reino Unido), entre outros. O seqüenciamento de BAC, fosmídeos e plasmídeos (WASHU) resultaram em uma cobertura de 6,6 vezes o genoma de 1,06 Gpb, tendo sido utilizado o DNA de uma única fêmea *Gallus gallus gallus (red jungle fowl)*, a espécie ancestral do frango atual (HILLIER et al., 2004).

As primeiras análises da sequência do genoma permitiram revelar alguns aspectos evolutivos e da biologia das aves. O tamanho pequeno do genoma, por exemplo, que corresponde a 35% do genoma dos humanos e 45% dos camundongos, é em parte reflexo de uma redução substancial no conteúdo repetitivo (11% em relação aos aproximados 50% do genoma de mamíferos), em número de pseudogenes (apenas 75 comparados aos 15.000 identificados em mamíferos) e duplicações de segmentos e de genes. Estas características influenciaram a qualidade da montagem do genoma, e uma cobertura de 98% foi alcançada para os autossomos. As exceções observadas foram os cromossomos sexuais, que apresentaram alto conteúdo de DNA repetitivo, e a região do cromossomo 16 que contém os genes do sistema MHC (*major histocompatibility complex*), com altas taxas de duplicações gênicas, ambas pobremente representadas na montagem final (HILLIER et al., 2004; BURT, 2005).

A predição do número de genes no genoma do frango ainda sofre com limitações técnicas, pois foi determinado por programas computacionais, associados aos dados gerados pelo

agrupamento de EST e pelo mapeamento físico de clones completos. O número provável está entre 20.000 a 23.000 genes (HILLIER et al, 2004).

O cariótipo da espécie foi determinado com marcadas diferenças em tamanho dos cromossomos e por isso, foram divididos em macro e micro-cromossomos. O cariótipo do frango ($2n=78$) é formado por um grupo de 38 autossomos, subdivididos em cinco macro-cromossomos, cinco intermediários e 28 mini-cromossomos, e um par de cromossomos sexuais (W e Z), sendo as fêmeas o sexo heterogamético. A densidade de genes é proporcionalmente maior nos mini-cromossomos (HILLIER et al., 2004; BURT, 2005). A correlação também é negativa para a taxa de recombinação, chegando a 6.4 cM/Mb nos mini-cromossomos em relação aos 2.8 cM/Mb observados nos macro-cromossomos. Ao contrário, observa-se que os tamanhos dos íntrons e das regiões intergênicas é maior nos macro-cromossomos.

Comparações de seqüências entre grupos evolucionariamente distantes permitem estabelecer o grau de sintonia entre as espécies e, conseqüentemente, a identificação de genes e das estruturas regulatórias, que ajustam para a quantidade de proteína sintetizada a partir de um gene. Aves e mamíferos dividem um ancestral comum a aproximadamente 310 milhões de anos (HEDGES, 2002). Isto faz das aves um excelente modelo na determinação dessas estruturas funcionais, uma vez que diferenças suficientes foram acumuladas ao longo desse período, permitindo a identificação das regiões similares com precisão de pares de bases (SCHUMUTZ; GRIMWOOD, 2004). Apenas 2,5% da seqüência do genoma do frango pôde ser alinhada com o genoma humano (BURT, 2005). Entretanto, fragmentos de 70 Mb foram alinhados, sugerindo que essas seqüências são altamente funcionais em ambas espécies (HILLIER et al., 2004; BURT, 2005).

Mais de 2,8 milhões de polimorfismos de base única (SNPs, do termo em inglês) foram identificados a partir da comparação da seqüência do genoma do ancestral (*Gallus gallus gallus*) com seqüências obtidas para três linhagens domesticadas: um macho de corte (*White Cornish*), uma fêmea de postura (*White Leghorn*) e outra fêmea de uma espécie ornamental (*Silkie* chinesa). A taxa total de substituição foi de cinco SNPs Kb^{-1} (WONG et al., 2004). A aplicação mais importante desses SNPs localizados será na análise de QTLs e outras características de interesse econômico, porque poderão contribuir para o aumento da densidade de marcadores nos mapas de ligação. Apesar de apresentar mais de 2.000 *loci*, o mapa de ligação de frangos contém apenas 800 microssatélites e SNPs, que são os marcadores mais informativos.

Um outro ponto observado a partir da análise dos SNPs foi que poucas diferenças em diversidade foram reveladas na comparação entre *Gallus gallus gallus* e as linhagens domesticadas e entre e dentro das linhagens domesticadas. Este dado sugeriu que a maioria da diversidade em nucleotídeos observada entre e dentro das linhagens domesticadas deve ter originado antes da domesticação. Esta é uma informação importante porque, o progresso do melhoramento genético dessas linhagens já visualiza um limite para os próximos 20 anos (BURT, 2002) e a recuperação de alelos novos com as espécies ancestrais representaria uma das possibilidades para dar continuidade aos programas de melhoramento. Mas tudo indica que, pelo menos para as aves, este caminho provavelmente não seria eficiente.

2.3 A detecção e a quantificação da expressão gênica por microarranjos

A habilidade de identificar genes por seqüenciamento de ESTs e genomas representou um avanço no sentido de permitir a extração da informação funcional em nível dos ácidos nucléicos, ao invés de partir de uma proteína e buscar por sua localização cromossômica (DUGGAN et al., 1999). Como resultado, inúmeras seqüências-motivo foram identificadas, que são seqüências codificadoras de domínios estruturais conhecidos e que fornecem pistas das funções biológicas que estes genes exercem no organismo. Foi assim que cerca de 40% dos genes presentes no genoma do frango tiveram suas funções biológicas previstas, com base no grau de similaridade com seqüências descritas para humanos e camundongos (HILLIER et al., 2004). Mas a seqüência não é a única fonte de informação funcional do gene. A detecção e a quantificação em larga escala do nível de expressão dos transcritos (genômica funcional) ou das proteínas correspondentes (proteômica) também representam informações funcionais importantes, porque revelam genes que são co-expressos espacial e temporalmente e as relações existentes entre eles. Complementam, portanto, as informações obtidas a partir da seqüência.

O acúmulo exponencial de seqüências nos bancos de dados inviabilizou o uso de métodos convencionais de quantificação da expressão gene a gene. *Northern blot* e RT-PCR, por exemplo, apesar de precisos e robustos, não apresentam a eficiência e a rapidez necessárias para acompanhar o ritmo de descoberta de genes novos imposta pelo seqüenciamento (CALSA JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004). Abordagens mais eficientes para a análise da

expressão gênica constituem um desafio presente para o estudo da expressão de um grande número de genes simultaneamente.

Os macro e microarranjos de clones de cDNA ou de oligonucleotídeos sintetizados *in situ* são métodos desenvolvidos para permitir a detecção e a quantificação da expressão gênica em larga escala. O princípio deste método baseia-se na hibridização de ácidos nucléicos, que é bastante sensível e específica, em consequência das propriedades de complementaridade entre fitas de ácidos nucléicos (DUGGAN et al., 1999). Os arranjos consistem em uma matriz altamente ordenada de inúmeras seqüências de DNA presas a uma plataforma, que pode ser uma membrana de náilon ou um slide de vidro. A amostra biológica de interesse fornece a população de RNAm que se pretende quantificar. Este RNAm é convertido pela transcriptase reversa em DNA complementar (cDNA) na presença de nucleotídeos modificados (com fluorescência ou radioisótopos). Quando hibridizado ao DNA preso na plataforma, este cDNA marcado emite um sinal, que é detectado por um *scanner* e convertido em uma leitura quantitativa relativa ao nível de expressão do gene (HAL et al., 2000).

Estes arranjos fornecem um acesso ilimitado ao perfil de expressão dos genes característicos de um tecido ou de um organismo, porque os genes, as ORFs (*open reading frames*) e até mesmo regiões intergênicas podem estar representadas na plataforma. As informações geradas por diversos experimentos podem ainda ser integradas e utilizadas para a determinação de funções biológicas dos genes desconhecidos, para gerar uma visão global da atividade transcricional de um genoma em resposta a qualquer estímulo ou para compreender os mecanismos que controlam o desenvolvimento (HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000).

Como todo método, os arranjos também apresentam algumas limitações. A necessidade de conhecimento prévio da seqüência do gene preso à plataforma é uma delas. Por isso, arranjos são construídos apenas para espécies que possuem seqüências genômicas ou ESTs disponíveis (CALSA JUNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004). Outras limitações incluem o alto custo dos equipamentos e a disponibilidade dos arranjos; problemas associados com hibridização cruzada entre transcritos e seqüências-alvo (causada pela duplicação de genes); e a restrita sensibilidade dos arranjos de ESTs para transcritos pouco freqüentes, pobremente representados nas bibliotecas e normalmente genes regulatórios importantes.

Experimentos seqüenciais de hibridização de arranjos geram resultados que consistem basicamente em listas de genes e de valores correspondentes que representam o nível

relativo de expressão dos transcritos detectados. Estas listas podem ser extremamente complexas, uma vez que os arranjos apresentam uma alta densidade de genes e para cada um deles os experimentos geram informações quantitativas referentes à expressão em tratamentos diferentes (a análise de cinco tratamentos em um arranjo contendo 5.000 clones, por exemplo, permite gerar uma matriz com 25.000 entradas). O enorme volume de dados torna imperativo o uso de programas computacionais para administrar e maximizar a quantidade de informações extraídas.

Harrington e colaboradores (2000) definiram os passos necessários para uma análise eficiente dos dados de microarranjos gerados após a obtenção da imagem processada: (1) normalização dos dados, (2) filtragem dos dados e (3) identificação do padrão. A normalização é necessária para permitir a comparação direta do padrão de expressão e deve ser efetuada tanto entre amostras no mesmo arranjo, quanto para o conjuntos de experimentos. A filtragem é importante para restringir o volume de dados; por exemplo, leva-se em consideração apenas os genes expressos acima de um determinado valor estipulado pelo experimentador e são desconsiderados aqueles que não apresentarem variação do nível de expressão entre os tratamentos. O último passo talvez seja o mais complexo. Encontrar o padrão ou os grupos de dados que podem ser usados para a determinação do significado biológico dentro de um enorme volume de dados pode não ser uma tarefa direta. A interpretação dos dados varia desde um lista de genes que são induzidos e reprimidos em função do tratamento, até análises de agrupamentos sofisticadas, como por agrupamento hierárquico ou por *sefl organizing maps* (SOM).

O agrupamento hierárquico tem sido tradicionalmente utilizado em análises filogenéticas e usa uma combinação progressiva de elementos mais similares para agrupar os genes por padrão de expressão. Os *sefl organizing maps* amostram o conjunto completo dos dados para determinar as distâncias entre eles e escolhe aleatoriamente pontos chamados centróides, a partir dos quais, os genes são organizados (HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000).

Vários arranjos tecido-específicos já foram desenvolvidos a partir das seqüências genômicas ou ESTs disponíveis de *Gallus gallus*. Estes incluem um arranjo intestino-específico, contendo 3.072 clones (HEMERT et al., 2003), um macrófago-específico contendo 4.906 clones (BLISS et al., 2005), um linfócito-específico com 3.011 clones (NEIMAN et al., 2001), um com 5.000 genes de função imune (SMITH et al., 2006) e um 11.000 genes expressos em células progenitoras de coração (AFRAKHTE; SCHULTHEISS, 2004). Há ainda os arranjos contendo

13.000 genes, disponibilizado pela ARK-Genomics e outro, também com 13.000 genes, que representam 24 tecidos adultos e embrionários de frangos (BURNSIDE et al., 2005). Estes arranjos representam ferramentas fundamentais na busca por funções de genes pela análise do padrão de expressão tecido-específico e, portanto, serão úteis para solucionar os inúmeros pontos que ainda não foram revelados por mapeamento de QTLs e seqüenciamento do genoma do frango.

2.4 O material genético brasileiro

Por volta das décadas de 1920 e 1930, os criadores brasileiros eram estimulados a aperfeiçoar apenas as raças ornamentais. O cenário mundial de escassez de alimento durante e após a segunda guerra mundial transformou a avicultura em um negócio atraente. A necessidade por um produto destinado a produção de carne deu início nos EUA a um programa de cruzamento entre as raças *New Hampshire* e *Plymouth Rock Barrada*, seguida de *Red Cornish*, *White Cornish* com *White Rock* (SOUZA, 2000; SOUZA; MICHELAN FILHO, 2004). Desde então, estas linhagens de aves vem sendo utilizadas por programas de melhoramento genético, que resultaram em aves altamente produtivas, selecionadas para as mais diversas características.

Estas raças foram importadas para o Brasil para serem utilizadas como precursores das linhagens puras dos programas de melhoramento nacionais. Este cenário continua o mesmo até hoje, de maneira que é correto afirmar que o material genético que dá origem ao frango nacional é de propriedade de grupos internacionais (SOUZA; MICHELAN FILHO, 2004). Atualmente, o segmento privado de produção de linhagens na avicultura brasileira se divide em três tipos: (1) a importação de avós por granjas denominadas avozeiros, (2) filiais de empresas estrangeiras e (3) empresas nacionais que trabalham sob regime de contrato de representação de produtos (MENDES; SALDANHA, 2004). A empresa Agrocerec Ross Melhoramento Genético de Aves S.A., do grupo Aviagen, possui um programa de melhoramento genético de frango de corte, que visa desenvolver material comercial para o Brasil. O híbrido comercial conhecido como AgRoss 308 já corresponde a 40% dos frangos de corte produzidos no Brasil (DA SILVA, 2006).

No setor público, o programa de melhoramento genético de aves da Embrapa Suínos e Aves (situada em Concórdia, SC) foi incrementado no final da década de 1980, sendo

que diversas linhagens comerciais de postura e corte tem sido lançadas em anos recentes, como por exemplo, a embrapa 011 e 021 (EMBRAPA). A Embrapa Suínos e Aves em conjunto com a ESALQ tiveram ainda a visão estratégica de desenvolver uma população experimental segregante para características de importância industrial e de produção derivada de cruzamentos entre linhagens de postura e corte. As linhagens parentais utilizadas tinham composições genéticas distintas, porque a linhagem de corte originou a partir de cruzamentos entre as raças *Cornish*, *Hampshire* e *White Plymouth Rock*; e a linhagem de postura, da *White Leghorn*.

A linhagem de corte, conhecida como TT, é uma linha macho que foi selecionada desde 1985, com o foco no melhoramento de características como peso corporal, conversão alimentar, rendimento de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade e redução da gordura abdominal e doenças metabólicas. Um total de seis gerações de seleção para estas características resultou na linhagem TT. A linhagem de postura CC foi selecionada por oito gerações desde 1989, visando melhorar características como produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e redução do peso corporal (NONES, 2004)

A população experimental foi criada a partir de cruzamentos recíprocos das duas linhagens, na proporção de um macho para cada fêmea. A geração F₁ foi obtida a partir do cruzamento de sete machos com sete fêmeas de cada linhagem, que resultaram em sete famílias obtidas do cruzamento entre machos de corte e fêmeas de postura (TC) e sete famílias do cruzamento de machos de postura com fêmeas de corte (CT). A geração F₂ foi formada a partir do cruzamento de um macho e três fêmeas de famílias diferentes das populações F₁, selecionadas ao acaso. Um total de sete machos e 21 fêmeas F₁ de cada cruzamento (CT e TC) gerou 100 pintinhos F₂ por família de F₁, em 17 incubações, totalizando cerca de 4.000 aves F₂, sendo metade de cada sexo e metade de cada cruzamento – TC e CT.

Características fenotípicas foram avaliadas e registradas para os animais desta população, associadas principalmente ao desempenho zootécnico (como por exemplo, peso vivo ao nascer, peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, eficiência alimentar), ao rendimento da carcaça (como peso de peito, peso do par de pernas, peso do par de asas) e a fisiologia dos animais (como peso do fígado, quantidade de triglicérides e glicose no sangue).

A partir disto, o laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP (Piracicaba, SP) deu início à genotipagem estrutural e funcional destes animais, que envolvia a construção de

mapas genéticos para o mapeamento de QTL e a identificação de genes funcionais, principalmente aqueles associados à deposição de tecido muscular esquelético.

Os mapas genéticos desta população vêm sendo construídos com o uso de marcadores microssatélites que, em associação com a avaliação fenotípica, vêm permitindo o mapeamento de QTLs. Esta estratégia de mapeamento foi inicialmente realizada para cada cromossomo independentemente, com QTLs mapeados para os cromossomos 1, 2, 3, 4 e 5 (RUY, 2004; BARON, 2004; NONES, 2004). No cromossomo 1, por exemplo, foram mapeados QTLs para características de performance e carcaça (NONES et al., 2005). QTLs afetando peso corporal, peso da carcaça, das coxas, das asas, de gordura abdominal e consumo alimentar foram mapeados em regiões identificadas anteriormente para outras populações (KAAM et al., 1998; SEWALEM et al., 2002; IKEOBI et al., 2004). A coincidência de regiões como essas, detectadas em experimentos independentes, são raras no genoma do frango (HOCKING, 2005), mas são importantes porque permitem validar as regiões associadas como reais influenciadoras das características analisadas. QTLs inéditos também foram mapeados no cromossomo 1 para peso de fígado, moela, pulmão, coração e pé e comprimento do intestino (NONES et al., 2005).

Fenotipicamente, as diferenças entre as linhagens genitoras de corte (TT) e de postura (CC) da Embrapa podem ser observadas desde o ovo. Aos nove dias de desenvolvimento embrionário o ovo da linhagem TT pesa em média 70,5 g, enquanto que o da CC pesa 59,3 g. Aos 17 dias embrionários, TT pesa 64,9 g e CC, 52,4 g (ALVES, 2004). O peso vivo de um pintinho da linhagem TT, com um dia após-eclosão, é em média de 51,97 g e o da CC, 39,19 g. Aos 41 dias, um frango da linhagem TT pesa 2.395 g em média e o da CC, 513 g.

Vários estudos procuram revelar os efeitos da seleção fenotípica sobre a origem de animais altamente musculares (REMIGNON et al., 1995; BURKE; HENRY, 1997; TESSERAUD; CHAGNEAU; GRIZARD, 2000; SCHEUERMANN et al., 2004). Estudos conduzidos por Coutinho e colaboradores (1993) revelaram que as diferenças fenotípicas observadas em animais adultos podem ser reflexo de eventos ocorridos durante o desenvolvimento embrionário. Estudando o desenvolvimento muscular em codornas, estes autores observaram um atraso na formação dos somitos (estruturas embrionárias precursoras de músculo) e na expressão de fatores miogênicos e de miosinas de cadeia pesada, na linhagem selecionada para crescimento em relação ao controle. Estes resultados levantaram a hipótese de que este atraso na expressão de fatores determinantes de células miogênicas seria responsável

pela maior taxa de proliferação de células precursoras antes de iniciar a diferenciação muscular. Conhecer as vias moleculares associadas ao programa miogênico permitiria, portanto, revelar genes candidatos influenciadores de maior ou menor potencial de deposição de tecido muscular esquelético em aves.

Com base nestes resultados, o grupo decidiu utilizar as linhagens CC e TT da Embrapa como modelo na investigação das bases moleculares associadas ao potencial de deposição muscular dos animais. Um dos primeiros passos foi a análise do nível de expressão dos conhecidos fatores miogênicos (MyoD, Myf5, miogenina e MRF4) e de crescimento (IGF I e II e TGF- β). Estádios distintos do desenvolvimento de frangos foram selecionados e o método de quantificação de transcritos escolhido foi RT-PCR quantitativo. Os resultados indicaram diferenças no nível de expressão para alguns desses genes (ALVARES, 2001; GABRIEL, 2001). Por exemplo, níveis significativamente menores de MyoD e miogenina foram identificados na linhagem TT, sugerindo mais uma vez o atraso no programa miogênico na linhagem selecionada para crescimento (ALVARES, 2001). O gene que codifica a miostatina revelou apresentar efeitos negativos sobre a proliferação celular (THOMAS et al., 2000). Níveis superiores de transcritos para miostatina foram detectados na linhagem CC, sugerindo uma associação desse gene com o reduzido potencial de crescimento dessas aves.

A identificação desses genes como diferencialmente expressos entre as linhagens sugeriu a utilização de MyoD, Myf5, miogenina, MRF4 e miostatina para selecionar animais com maior potencial de deposição muscular, ainda nos estádios embrionários do desenvolvimento. Alterações nas seqüências de nucleotídeos dos genes que codificam para estes fatores foram investigadas, concentrando-se principalmente em alterações de bases únicas, os SNPs. Caso fossem associados com características de interesse, estes SNPs poderiam ser utilizados como marcadores moleculares em programas de seleção. Os genes foram amplificados a partir de amostras de DNA de aves parentais e clonados para a identificação dos SNPs. A geração F₂ da população experimental foi utilizada para validação e genotipagem dos SNPs identificados. As associações entre os SNPs identificados e as características quantitativas de crescimento e desenvolvimento muscular foram testadas estatisticamente. Um polimorfismo no gene da miogenina foi associado às características de interesse, porém outras investigações ainda devem ser feitas para a introdução deste SNP como marcador em programas de seleção (DE SOUZA, 2004). Infelizmente, as regiões no DNA imediatamente 5' *upstream* aos genes que codificam

esses fatores de transcrição ainda não foram investigadas. Alguns trabalhos realizados em milho indicam que a maior diversidade na seqüência de nucleotídeos de genes chaves para o desenvolvimento e manutenção dos organismos reside justamente na região promotora ou reguladora da transcrição dos genes e não na região codificadora propriamente dita (WANG et al., 1999).

Ao mesmo tempo que estes genes candidatos estavam sendo testados por análises de expressão gênica pontuais e estudos de polimorfismos, ESTs estavam sendo geradas a partir de tecido muscular esquelético, hipófise e hipotálamo. O objetivo era identificar novos genes candidatos, que também estivessem associados ao programa miogênico e ao processo de crescimento. Um total de oito bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de somitos associados ao tubo neural (uma biblioteca no estágio HH15 do desenvolvimento embrionário, segundo HAMBURGER; HAMILTON, 1951), brotos de membros em estádios diferentes do desenvolvimento (uma biblioteca, HH21, HH24 e HH26), embriões inteiros (uma biblioteca, HH26) (JORGE et al., 2004); musculatura peitoral em estádios diferentes do desenvolvimento e para as linhagens CC e TT (*pool* de HH35 e HH43 para TT e CC e *pool* de 1 e 21 dias apenas para a linhagem TT, em um total de três bibliotecas) (ALVES, 2004), além de hipófise e hipotálamo (aves com 21 dias, uma biblioteca para TT e outra para CC) (dados ainda não publicados, comunicação pessoal de C.S.S. Cassoli). Um total de 13.664 ESTs foram geradas a partir dessas bibliotecas com o agrupamento via CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) indicando 6.744 possíveis genes. O banco de dados criado foi anotado com base no genoma de frango e humano e ESTs descritas para frango, humano e camundongo. Todas as ESTs obtidas foram depositadas no dbEST (NCBI), identificados como CD760792 a CD765430, C0502869 a C0507803 e CO419474 a CO423759.

Além de representar uma fonte importante de investigação de genes funcionais em frangos, estas EST serviram ainda de base para a construção de uma plataforma microarranjo contendo 4.534 clones (4.283 ESTs e 251 clones controles, aleatoriamente distribuídos) em duplicata. Este corresponde a um importante instrumento para o estudo de genes novos, para a determinação do padrão de expressão em função de alterações de estádios embrionários, avaliação das diferenças de potencial muscular entre as linhagens e identificação de genes tecido-específicos, entre outros. Os primeiros resultados da análise de expressão em larga escala utilizando esta plataforma serão discutidos nesta tese.

Além das informações biológicas que poderão ser extraídas a partir da análise do material genético desenvolvido no Brasil, é importante ressaltar que o convênio estabelecido entre a Embrapa e universidade também contribuiu para o desenvolvimento da capacidade técnica brasileira em biologia molecular aplicada a avicultura. A maior limitação para o uso da genética molecular em programas de seleção assistida por marcadores ainda é o alto custo das análises. Mas a geração de recursos genômicos em larga escala prometem tornar mais rápidos e eficientes os métodos de localização de genes responsáveis por características poligênicas. Esta eficiência transformará os sistemas de avaliação de marcadores moleculares, levando inevitavelmente à redução dos custos de sua geração e aumentando as chances de aplicabilidade direta em programas de melhoramento comercial.

2.5 O desenvolvimento da musculatura esquelética

A musculatura esquelética é o principal componente da massa de tecidos do organismo, correspondendo aproximadamente a 50% do peso corporal na maioria das espécies animais. Em espécies domésticas, esta musculatura contribui com a carne, que é fonte de proteínas de alta qualidade para o consumo, com uma composição de aminoácidos adequada às exigências nutricionais humanas.

A carne é um produto importante da agroindústria brasileira. A produtividade observada nos últimos anos colocou o país como um dos maiores produtores e o maior exportador de carne do mundo. Os rendimentos obtidos com este comércio têm influenciado a estabilidade da economia brasileira, auxiliando a equilibrar as contas no exterior e na sobrevivência de milhares de pequenos produtores pelo país. Nas previsões do USDA (Departamento de Agricultura dos EUA) para 2006, o Brasil permanecerá líder mundial nas exportações de carnes, respondendo isoladamente por 28% do comércio internacional. Isso corresponde à negociação de 5,5 milhões de toneladas das carnes bovina, suína, de frango e de peru, para um total mundial estimado em 19,6 milhões de toneladas. As exportações de carne bovina deverão situar-se em 1,8 milhão de toneladas, representando 26% do total negociado internacionalmente, enquanto as de frango são estimadas em 2,9 milhões de toneladas, 41% do comércio mundial (AVICULTURA INDUSTRIAL). É certo que, para continuar liderando as exportações mundiais de carnes, o Brasil precisa investir em eficiência, para reduzir os custos de

produção, e em cuidados com sanidade, que somente nos dois primeiros meses de 2006 resultaram em embargues de 618 mil toneladas, em função da disseminação da gripe aviária na Europa e da febre aftosa no Brasil.

Por estes motivos, a musculatura esquelética é alvo de vários estudos, incluindo os realizados pela ESALQ-USP. O objetivo é compreender os mecanismos biológicos associados à origem e maturação das fibras musculares, para identificar variáveis que possam causar impacto sobre a deposição muscular em animais domésticos.

Os avanços observados em quantidade de massa muscular nos animais domésticos foram alcançados por programas de seleção tradicional e, portanto, baseado em caracteres fenotípicos identificados na fase após nascimento ou pós-eclosão. Entretanto, os estudos do desenvolvimento da musculatura esquelética revelaram que esta fase contribui praticamente apenas com o aumento em volume das fibras musculares, por deposição de proteínas, um processo conhecido por hipertrofia muscular (MOSS, 1968). É na fase embrionária que ocorre a determinação do número de células precursoras que irão expressar genes músculo-específicos (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002).

Foi comprovado ainda que o número de fibras musculares é sensível aos programas de seleção fenotípica (SCHEUERMANN, 2004). As análises do músculo *semimembranosus*, por exemplo, revelaram o dobro de fibras musculares nas linhagens comerciais de frango em relação aos frangos comuns (BURKE; HENRY, 1997). A comparação entre frangos de crescimento rápido e lento também revelou um número 20% maior de fibras no músculo *latissimus dorsi* nas aves de crescimento rápido em relação às de crescimento lento (REMIGNON et al., 1995). O músculo *pectoralis* de frangos selecionados para corte também apresentaram o dobro de fibras musculares em relação às aves de postura (SCHEUERMANN et al., 2004).

Estas características relacionadas à idade de determinação e as influências da seleção sobre o número de fibras, transformaram o programa miogênico em uma fonte de busca de genes candidatos. Estes genes poderiam gerar marcadores moleculares que permitissem a avaliação do potencial muscular do animal já nos estádios embrionários ou serem manipulados *in vivo* para a obtenção de transgênicos altamente musculares, indicando a importância da estrutura e origem da musculatura esquelética em vertebrados.

A musculatura esquelética é formada por feixes de fibras, organizados por três grupos de membranas compostas por tecido conjuntivo: o endomísio, que recobre as fibras musculares; o perimísio sobre o feixe de fibras; e o epimísio, que delimita o músculo. A fibra muscular é a unidade fundamental do músculo. Possui de 10 a 100µm de diâmetro e vários centímetros de comprimento. A fibra é composta por 1.000 a 2.000 miofibrilas, formadas pelos miofilamentos. As principais proteínas dos miofilamentos são miosinas e actinas, que exercem o mecanismo de contração muscular, em conjunto com outras 20 proteínas regulatórias, entre elas as tropomiosinas, troponinas, a alfa e beta actinas.

Morfologicamente, a musculatura esquelética tem origem em estruturas embrionárias conhecidas como somitos, que são blocos segmentados de mesoderme paraxial que se formam em seqüência antero-posterior em ambos os lados do tubo neural e da notocorda do embrião (revisado por LUDOLPH; KONIECZNY, 1995; ARNOLD; BRAUN, 2000). Durante o desenvolvimento embrionário, os somitos se compartimentalizam dorso-ventralmente (DV) dando origem ao dermomiótomo epitelial dorsal e ao esclerótomo mesenquimal ventral (Figura 1). O esclerótomo é responsável pela origem das linhagens de células condrogênicas e de fibroblastos, que formarão a coluna vertebral e as costelas (HUANG et al., 1996); e o dermomiótomo forma a derme dorsal e contribui com os precursores miogênicos que irão formar a musculatura esquelética do corpo (ARNOLD; BRAUN, 2000; BUCKINGHAM, 2003; DIETRICH, 1999). A diferenciação ventral dos somitos em esclerótomo é induzida por sinais liberados pelo tubo neural e notocorda, como *Sonic Hedgehog* (Shh), *Noggin* e FGF (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002). O dermomiótomo é mantido por sinais dorsais provenientes da ectoderme superficial, mediados principalmente pela família de proteínas *Wnt* (*Wnt1*, *Wnt3a*, *Wnt4* e *Wnt6*). Estas proteínas induzem a expressão de *Pax3*, *Pax7* e *Sim1* no dermomiótomo (FAN; LEE; TESSIER-LAVIGNE, 1997).

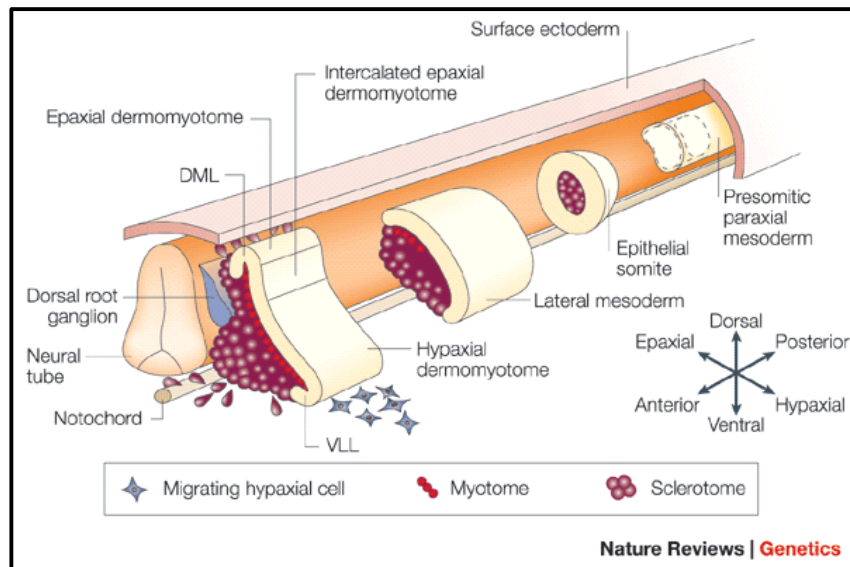


Figura 1 - Esquema representativo do desenvolvimento dos somitos em dermomiótomo dorsal, esclerótomo ventral e miótomo intermediário. Retirado de Parker; Seale; Rudnicki, (2003)

O dermomiótomo forma o primeiro músculo embrionário, o miótomo, posicionado entre o dermomiótomo dorsal e o esclerótomo ventral, formado por ondas de deposição de mioblastos (DENETCLAW; ORDAHL, 2000; GROS; SCAAL; MARCELLE, 2004; AHMED; CHENG; DIETRICH, 2006). A derme e a musculatura profunda das costas é formada por precursores epaxiais derivados do dermomiótomo médio e o miótomo, um dos mecanismos mais antigos de formação de músculo dos organismos (BIRCHMEIER; BROHMANN, 2000; ORDAHL; LE DOUARIN, 1992). A musculatura hipaxial da parede do corpo e dos membros é formada por precursores provenientes do dermomiótomo lateral, como uma população de células migratórias (DIETRICH, 1999; PARKYN et al., 2002). Este é um mecanismo que surgiu recentemente na evolução e é observado em teleostes e animais superiores (BIRCHMEIER; BROHMANN, 2000).

A especificação dos precursores hipaxiais miogênicos ainda não é completamente conhecida. As proteínas *Wnt*, além de atuarem sobre a manutenção do dermomiótomo, também parecem ser necessárias para a formação desta linhagem celular (SCHIMIDT; TANAKA; MUNSTERBERG, 2000). *BMP4* revelou induzir a expressão de *Sim1* (POURQUIÉ et al., 1996), *Lbx1* (DIETRICH et al., 1998) e *c-met* (BLADT et al., 1995), todos marcadores característicos de

dermomiótomo lateral. Portanto, proteínas *Wnt* e *BMP4* provavelmente atuam na especificação dos precursores hipaxiais miogênicos (DIETRICH et al., 1998).

Já está definido o papel da família MyoD de fatores de transcrição durante o programa miogênico (revisado por PURI; SARTORELLI, 2000). Duplo mutantes MyoD/Myf5 não formam musculatura esquelética porque a população de precursores de mioblastos encontra-se ausente (RUDNICKI et al., 1993). A ausência desses fatores ainda revela que as células precursoras de mioblastos não se localizam nos sítios normais de miogênese e por isso, adotam outros destinos (TAJBAKHSI et al., 1996), demonstrando, portanto, o papel de MyoD e Myf5 como fatores de determinação miogênica. MRF4 e miogenina e também MyoD agem mais tarde no programa, como fatores de diferenciação (HASTY et al., 1993; BRAUN; ARNOLD, 1995).

Os precursores de musculatura epaxial (das costas) expressam MyoD e proteínas musculares imediatamente após a definição dos compartimentos dos somitos (ORDAHL et al., 2001). Ao contrário, os precursores hipaxiais precisam deixar o dermomiótomo lateral por de-epitelialização e migrar para colonizar outras regiões, antes de dar início ao programa miogênico (WILLIAMS; ORDAHL, 1994; BIRCHMEIER; BROHMANN, 2000). O mecanismo molecular que determina o processo migratório foi estudado nos membros e parece acontecer por interação entre o receptor transmembrana quinase de tirosina *c-met*, que é expresso nas células do dermomiótomo, e o ligante *scatter factor/hepatocyte growth factor* (SF/HGF), produzido nas células da somatopleura dos membros (BLADT et al., 1995; DIETRICH et al., 1998). O promotor para *c-met* contém um sítio de ligação para Pax3, o que sugere a participação deste fator na liberação dos precursores migratórios *in vivo*. Estes precursores migratórios e as células proliferativas da massa pré-muscular dos membros expressam Pax3, Pax7 e Myf5 (KIEFER; HAUSCHKA, 2001).

Há ainda outros pré-requisitos para a migração dos precursores hipaxiais. Fibronectinas devem estar disponíveis nos espaços intracelulares (BRAND-SABERI et al., 1993). Além disso, estes espaços devem ser largos o suficiente, o que *in vivo* é alcançado por um gradiente de concentração de ácido hialurônico (KRENN; BRAND-SABERI; WACHTLER, 1991). O receptor quinase de tirosina EphA4 é altamente expresso na porção lateral do dermomiótomo ao nível da origem dos precursores migratórios (SCHMIDT et al., 2001). A interação entre EphA4 e efrinasA5 parece orientar a migração das células para o local apropriado nos membros (SWARTZ et al., 2001)

Quando atingem a massa pré-muscular alvo, os precursores hipaxiais migratórios iniciam o processo de crescimento muscular por proliferação celular. Este é o processo que determina o número de fibras musculares do organismo adulto. MyoD é expresso nos mioblastos proliferativos, mas interessantemente não se observa sinais de marcadores de fenótipo muscular nestas células. Portanto, deve haver um controle da atividade de MyoD nos mioblastos proliferativos. Este controle é exercido por uma via de sinalização que inclui a atividade da ciclina D1, que é um regulador chave do progresso da divisão celular. Fatores de crescimento liberados no meio induzem a atividade mitótica desta ciclina D1, que por sua vez induz um aumento dos níveis de Cdk4, uma quinase dependente de ciclina. É esta Cdk4 que inibe a função de MyoD enquanto está ocorrendo a divisão celular. A redução dos níveis de ciclina D1, por diminuição da sinalização mitogênica, libera MyoD para ser funcional, o que acaba por ativar a miogênese e genes que mantêm ciclo celular parado, como p21 e Rb (WEI; PATERSON, 2001).

Os fatores de crescimento do fibroblasto (*fibroblast growth factors*, FGF) ainda têm potencial de ativar uma outra via de sinalização nos mioblastos proliferativos, também com atividade regulatória sobre os fatores miogênicos. A ligação entre bFGF e os receptores FGFR1 e FGFR4 desencadeia uma via de sinalização intracelular que envolve a ativação de uma quinase de proteína C (PKC). Esta PKC reduz a atividade da miogenina e de MyoD, por meio de uma reação de fosforilação em um resíduo de treonina conservado na seqüência de aminoácidos destes fatores (LI et al., 1992; ALVARES, 2001). Proteínas com propriedades oncogênicas como c-Jun em associação com fator de transcrição AP-1 e proteínas Id também têm potencial inibitório sobre a atividade de MyoD em mioblastos proliferativos (BENGAL et al., 1992; LASSAR; MÜNSTERBERG, 1994). Outros reguladores do crescimento e diferenciação de mioblastos ainda incluem *Twist* e a via de sinalização Notch (FÜCHTBAUER, 1995; DELFINI et al., 2000)

Terminado o evento de proliferação, os mioblastos saem do ciclo celular para dar início ao programa de diferenciação, dando origem às fibras musculares. Este programa é dependente da atividade de MyoD, MRF4 e Miogenina. Estes fatores miogênicos ativam a transcrição dos genes alvo ligando-se a uma região específica do DNA, o *E-box* (CANNTG), presente nos *enhancers* de genes músculo-específicos. A ligação eficiente ao DNA é obtida por heterodimerização desses fatores de transcrição com proteínas não-miogênicas E2A e fatores estimulatórios de miócitos 2 (*myocyte enhancer factor 2*, MEF2). Juntos, estes fatores ativam o

programa de diferenciação muscular, por indução da transcrição de genes estruturais músculo-específicos (LASSAR et al., 1991; PURI; SARTORELLI, 2000).

Todos os músculos anatômicos dos vertebrados adultos têm origem em várias ondas de miogênese, que resultam na formação das fibras musculares ao longo do desenvolvimento do animal (STOCKDALE, 1997). As fibras primárias formam durante o desenvolvimento embrionário e suportam todos os futuros músculos. A quantidade de massa muscular formada por estes mioblastos primários é extremamente pequena e a função talvez seja de definir o tipo, a forma e a localização do músculo. A segunda onda de formação de fibras (as fibras secundárias) ocorre sobre a superfície das fibras primárias, começando próximo aos sítios de inervação. Aumentam rapidamente em número e nucleação e se separam das fibras primárias (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002).

Com isso, os mioblastos precursores de fibras podem ser divididos em três tipos de acordo com a idade: os embrionários, os fetais e as células satélites (STOCKDALE, 1997). Estes mioblastos podem formar dois tipos de fibras musculares: aquelas de contração lenta ou rápida. O comprometimento dos mioblastos com a formação de um dos tipos de fibra parece estar associado às ondas miogênicas. Os tradicionais experimentos de transplantes de somitos entre frangos e codornas comprovaram que os mioblastos embrionários possuem a informação intrínseca para formar fibras lentas ou rápidas desde o somito e, portanto, são independentes de sinais do meio (NIKOVITS et al., 2001). O músculo *Pectoralis* de frangos é composto quase exclusivamente de fibras de contração rápida, enquanto que em codornas, este músculo é composto por uma mistura entre fibras lentas e rápidas. Quando os três primeiros somitos formados durante o desenvolvimento (os responsáveis por gerar a população de precursores hipaxiais responsáveis por formar a musculatura peitoral) são removidos de embriões de frango e transplantados para a mesma posição nas codornas, praticamente todos os tipos de fibras primárias formadas na musculatura peitoral são de contração rápida, recapitulando o fenótipo do frango. Ao contrário, quando são os precursores provenientes da codorna que migram para o estroma peitoral de frango, o fenótipo de codorna de população mista é observado. Portanto, os mioblastos primários já estavam intrinsecamente programados para formar fibras rápidas, no caso de frangos e mistas, no caso das codornas.

Este comprometimento intrínseco é único dos mioblastos primários. Os mioblastos secundários (fetais e as células satélites) parecem ser influenciados pelo estroma colonizado para

determinar a identidade do tipo de fibra a ser formada. Um dos mecanismos que levam à aquisição dessa identidade está associado à sinais provenientes da inervação da musculatura (ZHANG; McLEMMANN, 1998; NIKOVITS et al., 2001; BUCKINGHAM et al., 2003). Sinais liberados pelos nervos convertem fibras lentas em rápidas. A via de sinalização que atua neste sistema parece ser a calcineurina dependente da ativação por Ca^{2+} , que atua ativando o fator de transcrição NFAT (OLSON; SANDERS-WILLIAMS, 2000). Entretanto, genes específicos de fibras lentas não têm necessariamente sítios para este fator de transcrição (CALVO et al., 1999). MEF2 e o fator de transcrição do tipo II-1 (TFII-1) aparecem como mediadores da via de sinalização da calcineurina, potencialmente envolvidos em traduzir os sinais provenientes dos nervos (OLSON; SANDERS-WILLIAMS, 2000). A via de sinalização Ras/MAPK/ERK também parece ser importante mediadora da ativação de genes característicos de fibras lentas (MURGIA et al., 2000).

2.6 Orientadores de axônios e o desenvolvimento da musculatura esquelética

A importância biológica da associação entre o sistema nervoso e o muscular vai além dos efeitos sobre a determinação da identidade das fibras musculares durante a diferenciação. Os músculos são os órgãos ativos do movimento e esta capacidade é exercida via a transmissão de impulsos ou estímulos emitidos pelo sistema nervoso que resultam na contração da fibra muscular. O impulso nervoso percorre os neurônios motores e são percebidos pelos neurônios sensores, resultando, subseqüentemente, na excitação dos músculos de contração. Portanto, a musculatura esquelética é inervada tanto por neurônios motores como por neurônios sensores, os quais se comunicam, no caso mais simples, por arco reflexo monosináptico.

Esta associação entre os dois sistemas ocorre desde os primeiros estádios do desenvolvimento embrionário. Nos vertebrados superiores, os axônios motores que deixam o cordão espinal via ramo ventral e os axônios sensores projetados via ramo dorsal se juntam para formar o nervo espinal. Ao nível torácico, este nervo espinal se divide em dois componentes principais, o ramo dorsal e o ventral. São estes os ramos nervosos que contatam os somitos em desenvolvimento.

Estudos anatômicos determinaram que o contato entre estes ramos do nervo espinal e os somitos ocorre antes da subdivisão molecular do dermomiótomo em domínios

epaxial-hipaxial (TOSNEY, 1988; SHARMA et al., 2000). Mais interessante ainda é que estes dois ramos inervam diferentemente os dois domínios do dermomiótomo, sendo que o ramo dorsal é orientado para inervar apenas o domínio epaxial e acompanha o desenvolvimento desta musculatura até a maturidade; e o ramo ventral inerva apenas o domínio hipaxial do dermomiótomo, que formará a musculatura hipaxial do corpo (TOSNEY, 1988; GOULDING et al., 2002; SHIRASAKI; PFAFF, 2002).

Esta subdivisão epaxial-hipaxial do dermomióto é uma das maiores inovações da miogênese dos vertebrados superiores, ocorrendo desde a superclasse dos *gnathostomatas* (peixes com mandíbulas), a partir de *Danio rerio*, o popular *zebrafish*. Esta subdivisão permitiu pela primeira vez na evolução o complexo movimento 3D da musculatura. A formação deste limite parece ser um processo fundamental para o desenvolvimento embrionário, pois determina o desenvolvimento correto dos dois grupos de musculatura esquelética a partir dos precursores do dermomiótomo e a conexão entre os ramos dorsal e ventral do nervo espinal sobre os domínios dos somitos. Este corresponde ao primeiro contato entre estes dois sistemas que atuam biologicamente em conjunto (TANNAHILL et al., 2000).

Estudos que envolveram a ablação micro-cirúrgica (TOSNEY, 1987) ou genética (KABLASR; RUDNICKI, 1999) do dermomiótomo epaxial revelaram um impedimento na formação do ramo dorsal do nervo espinal. Além disso, a ablação dos neurônios motores resultou em falhas nas projeções dos neurônios sensores em direção a seus alvos (LANDMESSER; HONING, 1986). Somado às observações morfológicas, estes resultados sugerem a existência de um mecanismo molecular comum entre a subdivisão dos domínios do dermomiótomo e a inervação diferencial dos ramos nervosos. A hipótese é que a musculatura esquelética em desenvolvimento esteja fornecendo as pistas de sobrevivência e orientação para os axônios motores em crescimento, enquanto que estes preparam o meio para o crescimento dos axônios sensores.

Esta hipótese ainda não foi comprovada *in vivo*, mas alguns candidatos da via molecular já foram sugeridos. São fatores de transcrição que apresentam padrão de expressão específico para um dos domínios do dermomiótomo, respeitando os limites epaxial-hipaxial estabelecido pelas células pioneiras. *En1* foi identificado como marcador específico de domínio epaxial do dermomiótomo dos somitos e *Sim1* como específico de domínio hipaxial (CHENG et al., 2004; AHMED; CHENG; DIETRICH, 2006).

Durante o crescimento dos ramos nervosos projetados do nervo espinal, os cones dos axônios em crescimento alteram sua morfologia para emitir projeções que ativamente amostram o meio em busca de pistas de orientação de direção. Estas pistas são fornecidas por moléculas orientadoras de axônios, que são proteínas extracelulares produzidas pelos tecidos próximos e liberadas no meio para atuar como sinais de atração ou repulsão de crescimento dessas projeções (TESSIER-LAVIGNE; GOODMAN, 1996; CHILTON, 2006).

O mecanismo celular que determina a atração ou a repulsão de células é normalmente determinado pela ligação e ativação de receptores pelas moléculas ligantes correspondentes. O primeiro desses sistemas identificado como orientador de axônios foi o receptor Eph e as efrinas ligantes, que atuam como repelentes do crescimento de axônios em inúmeras regiões do desenvolvimento neural, incluindo nos somitos (GALE et al., 1996). Estes receptores são do tipo quinase de tirosina. As inúmeras efrinas ligantes podem ser divididas em dois grupos principais, de acordo com o modo de ligação à membrana plasmática: as efrinas-A ligam-se à membrana pela âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI anchor); e as efrinas-B dependem de um receptor com domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. Esta divisão dos ligantes também divide os receptores em EphA e EphB (TANNAHILL et al., 2000).

Uma outra família de moléculas orientadoras de axônios foi recentemente identificada nas projeções da retina de embriões de frangos, conhecidas como moléculas orientadoras por repulsão (do inglês, *repulsive guidance molecules*, RGM) (MONNIER et al., 2002). RGM-A foi o primeiro membro identificado desta família (MONNIER et al., 2002). No genoma de camundongos foram identificados dois outros membros desta família, denominados de RGM-B e RGM-C. O gene que codifica para RGM-A é estruturalmente semelhante ao RGM-B, o que implica em uma provável origem por duplicação gênica; enquanto que RGM-C não compartilha das mesmas semelhanças (SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004). Ortólogos para os três membros da família RGM foram ainda encontrados nos genomas de rato e de humano (SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004). Porém, até o momento, apenas RGM-A e RGM-B foram identificados no genoma do frango (sob números de acesso AY128507 e XM_424860, respectivamente).

Os membros desta família dividem 50-60% de identidade de aminoácidos e apresentam características estruturais similares, incluindo uma sequência sinal na porção N-terminal e um sítio de clivagem proteolítica conservado, definido como von Willebrand do tipo D

(vWF-type D domain) (MONNIER et al., 2002; MATSUNAGA; CHÉDOTAL, 2004). Diferente de RGM-B, RGM-A e RGM-C possuem ainda um domínio RGD, provavelmente envolvido com processos de interação célula-célula. Como os receptores EphA, todos os membros da família RGM possuem o domínio transmembrana do tipo âncora de GPI, na porção C-terminal da proteína.

RGM-A é o membro da família que apresenta a maior homologia com o primeiro RGM identificado no genoma do frango. RGM-A e RGM-B são descritos como expressos especificamente no sistema nervoso central, de maneira complementar, enquanto que RGM-C foi caracterizado como específico de tecido muscular esquelético (MATSUNAGA; CHÉDOTAL, 2004; SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004).

RGM-A é expresso no hipocampo e *dentate gyrus* (que é uma parte da formação do hipocampo). Experimentos *in vitro* de culturas de hipocampo sugerem que RGM-A também atue como orientador repulsivo no controle da especificação das projeções para esta região do hipocampo (BRINKS et al., 2004). O *knockout* de RGM-A também já foi realizado em camundongos. Nestes animais, as projeções dos axônios da retina são normais, mas não são expressos em gradiente, como nos animais controle. O principal fenótipo observado nos animais transgênicos foi o defeito no fechamento do tubo neural cefálico (NIEDERKOFER et al., 2004).

Neogenina foi identificado como o receptor de RGM-A de frango (RAJAGOPALAN et al., 2004). Este receptor foi inicialmente identificado como homólogo de *deleted in colorectal cancer* (DCC) (VIELMETTER et al., 1994), revelando estar envolvido com a morfogênese epitelial em glândulas mamárias, tubo neural e durante a formação dos somitos (MAWDSLEY et al., 2004). Nas projeções dos axônios da retina, este sistema RGM-A/Neogenina também foi identificado como sinal de orientação repulsiva (RAJAGOPALAN et al., 2004). Este sistema foi ainda associado à sobrevivência dos neurônios do tubo neural de embriões de frango (MATSUNAGA et al., 2004). A superexpressão de neogenina induziu o programa de apoptose e a co-superexpressão de RGM-A reprimiu o programa de morte celular, sugerindo que neogenina é um receptor dependente de RGM-A.

RGM-B também é conhecido como Dragon (SAMAD et al., 2004, 2005). Dragon/RGM-B foi caracterizado como co-receptor de proteínas de morfogênese de ossos (*Bone Morphogenic Proteins*, BMP), porque tem o potencial de ligar-se aos receptores e aos ligantes da via BMP e de induzir especificamente esta sinalização, sem interferir em vias de sinalização de

outros membros da família TGF- β (SAMAD et al., 2004, 2005). Dragon/RGM-B liga-se diretamente a BMP2 e BMP4, mas não a BMP7 e outros ligantes de TGF- β . Recentemente, RGM-A também foi caracterizado como um co-receptor da sinalização BMP, com as mesmas características de Dragon/RGM-B (BABITT et al., 2005).

Em humanos, RGM-C é conhecido como Hemojuvelin e foi caracterizado como altamente expresso no fígado, coração e musculatura esquelética. Uma mutação neste gene foi associada ao fenótipo de hemacromatose juvenil do tipo 2 (*Hemachromatosis type 2*, Hfe2), que causa uma desordem por excesso de ferro (RODRIGUEZ-MARTINEZ; NIEMELA; PARKKILA, 2004). Transcritos para RGM-C foram identificados como induzidos durante sobrevivência e diferenciação de células musculares mediadas por fatores de crescimento em experimentos de microarranjos em camundongos (KUNINGER et al., 2004). Estes autores identificaram posteriormente a expressão de RGM-C em cultura de células musculares e durante o desenvolvimento embrionário; um padrão de expressão similar ao fator miogênico miogenina em cultura de células; e detectaram transcritos no miótomo, compartimento do somito que dá origem à maioria da musculatura esquelética dos membros e coluna. Verificaram também que, em estágios mais avançados do desenvolvimento, a expressão deste gene se restringe a células musculares cardíacas e esqueléticas. Entretanto, nenhuma função biológica foi atribuída a RGM-C até o momento (SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microarranjos de colônias bacterianas

3.1.1 Confeção e processamento das membranas

As membranas de colônias bacterianas foram confeccionadas no *Brazilian Clone Collection Center*, localizado na Universidade do Estado de São Paulo – Unesp, campus de Jaboticabal-SP (BCCC). Inicialmente, o arranjo foi construído em placas de 384 poços (GENETIX). Foram necessárias 12 destas placas para arranjar os 4.534 clones. Os clones de bactéria foram inoculados a partir das placas estoques de 96 poços para as placas do arranjo (384 poços) em meio líquido CG (Circle Grow – BIO 101) suplementado com 1 % de ampicilina (GIBCO–BRL) e 8 % de glicerol (MERCK) e crescidos por 16 – 18 horas a 37°C. Tanto o arranjo em placas quanto a transferência das culturas de bactérias para as membranas de náilon foram feitos pelo robô Q-Bot (Genetix).

As membranas foram construídas a partir do arranjo em placas de 384. Em uma membrana de náilon de alta densidade (PerForma II – GENETIX) com dimensões 22,5 x 22,5 cm², foram construídas seis microarranjos idênticos, com dimensões 8 x 12 cm². Cada membrana é dividida em 384 quadrantes (Figura 2). A posição do quadrante na membrana indica a posição do clone em sua placa de 384 poços original. Em cada quadrante foram depositados 24 clones bacterianos em um arranjo 5x5 (a posição central, indicada pela letra G na figura, não foi utilizada no microarranjo). Cada número dentro do quadrante indica o número da placa de origem daquele clone. Assim, por exemplo, todos os clones das posições A1 das placas de 384 poços foram transferidos para o quadrante A1 da membrana, em duplicata. Portanto, cada clone na membrana pôde ser identificado quanto a sua placa (número dentro do quadrante) e posição de origem (quadrante dentro da membrana). Este arranjo permitiu a transferência de todos os 4.534 clones selecionados, em duplicata, totalizando 9.068 pontos.

3	4	2	4	1
5	9	6	10	9
7	10	G	1	7
8	5	2	8	11
12	11	3	6	12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Figura 2 - Esquema representativo da membrana utilizada para a construção dos microarranjos. Cada quadrante corresponde a uma posição na placa de 384. Em cada quadrante há 25 posições arranjadas 5x5. Todos os clones contidos neste quadrante destacado são oriundos das posições A1 de suas respectivas placas de 384 de origem

As membranas de náilon foram inicialmente umedecidas em meio CG suplementado com 0,5 % de ampicilina. Essas membranas foram colocadas sobre papel *Whatman* 3M também umedecidos neste meio. Durante a transferência, o robô imergiu sua cabeça, com 384 pinos, por 3 segundos, na placa de 384 poços contendo as culturas bacterianas. Em seguida, imprimiu os pinos na membrana, fazendo uma leve pressão por 10 milissegundos e depositando cerca de 20 nL da cultura. Cada clone foi impresso a uma distância de 900 microns em relação aos outros. Este processo foi repetido de acordo com o arranjo pré-determinado para os seis campos do filtro de 22,5 x 22,5 cm². Em seguida, a placa com as culturas bacterianas foi trocada, e a cabeça do robô lavada automaticamente em uma solução de água sanitária, seguida de água Milli-Q e etanol absoluto (SYNTH). Após a lavagem, os pinos foram secos com um jato de ar. Após esterilização, o robô esperou mais 6 segundos para iniciar a transferência das culturas bacterianas da placa seguinte. O processo de limpeza e secagem foi repetido a cada troca de placa. As membranas de náilon foram então colocadas em uma placa (QTray – GENETIX) contendo meio CG semi-sólido suplementado com 1 % de ampicilina. As membranas foram invertidas e incubadas à 37°C por 8 horas, para o crescimento das colônias bacterianas.

Depois de 8 horas a 37°C, as membranas foram colocadas sobre papel *Whatman* 3M umedecido em solução desnaturante (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M), por 4 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o papel *Whatman* 3M foi trocado por um fresco também umedecido com solução desnaturante e as membranas incubadas por 4 minutos em uma placa de vidro dentro do banho-maria com água fervente. As membranas foram então transferidas para outro papel *Whatman* 3M umedecido em solução neutralizante (NaCl 1,5 M e Tris 1 M, pH 7,0), onde permaneceram 4 minutos. Após neutralização, as membranas foram colocadas sobre papel *Whatman* 3M seco e incubadas por 4 minutos. Secas, as membranas foram transferidas para uma solução de proteinase K (NaCl 5 M; Tris 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; 10X Sarcosil; 1,5 % de Proteinase K). As membranas foram invertidas nesta solução, com a face das colônias submersa. Posteriormente, foram incubadas por 1 hora à 37°C em agitador orbital a 50 rpm. O excesso de solução foi então retirado com o auxílio de um papel filtro. As amostras de DNA plasmidial foram fixadas às membranas utilizando-se o aparelho *Ultraviolet Crosslinker* (CL-508), através de exposição a 120.000 microjoules por cm² por 30 segundos.

3.1.2 Sonda plasmidial para a normalização dos microarranjos

Uma sonda plasmidial foi utilizada a fim de determinar a quantidade de DNA fixada nas membranas. *Overgo* é a denominação utilizada para o método que utiliza oligonucleotídeos como sondas. Estes oligos foram sintetizados com base em um fragmento de 36 pares de base do gene da β -lactamase de resistência à ampicilina às células transformadas (Figura 3), complementares 8 pares de base na extremidade 3'. Todos os clones de bactérias utilizados para a confecção das membranas continham o gene de resistência à ampicilina no plasmídeo pSPORT1 (INVITROGEN), permitindo assim, o uso do método.

<p>5' TAGACTGGATGGAGGCGGATAA 3' não codificadora (243-222) 3' CGCCTATTTC AACGTCCTGGTG 5' codificadora (208-229)</p>
--

Figura 3 – Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na síntese da sonda a partir do método *overgo*

Os dois oligonucleotídeos sintetizados foram misturados a uma concentração final de 10 μ M para a reação de marcação com α^{33} P-dCTP (GE HEALTHCARE). Esta solução foi incubada a 80°C por 5 minutos, seguida de 37°C por 10 minutos em bloco aquecedor (BOEKEL SCIENTIFIC) e imediatamente armazenada no gelo. Para um volume final de 10 μ L de reação de marcação foram adicionados 10 μ M da mistura de oligonucleotídeos, 1 μ g de BSA (albumina soro bovina, GIBCO-BRL), 2 μ L de solução OLB [10 μ L de solução A (Tris 1.25 M; MgCl₂ 1.5 mM; 18 μ L β -mercaptoetanol; 15 μ L d(ATG) 100 μ M); 25 μ L de solução B (2 M Hapes-NaOH); 15 μ L de solução C (Tris 3 mM; EDTA 0,2 mM)], 50 μ Ci de α^{33} P-dCTP e 2U de *Klenow* DNA polimerase I (INVITROGEN). O híbrido formado pela complementaridade de 8 pb entre os dois oligos forneceu o molde para a polimerização no sentido 3'- 5' da enzima *Klenow*, com a simultânea introdução dos nucleotídeos modificados por α^{33} P. A reação foi incubada em temperatura ambiente por uma hora. Após a síntese, o volume final foi ajustado para 50 μ L e a

sonda foi purificada em coluna *sephadex* G-50 (GE HEALTHCARE), de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez purificada, a sonda foi imediatamente utilizada.

Antes de iniciar a pré-hibridização, as membranas foram lavadas com solução fervente de 0,5 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 5 minutos sob agitação lenta, para diminuir o resíduo de fundo (*background*). Todas as membranas foram colocadas em um mesmo recipiente para serem lavadas, pré-hibridizadas e hibridizadas, sendo separadas uma da outra por uma malha de filtro.

A pré-hibridização foi realizada em uma solução contendo 1 g de BSA (GIBCO-BRL), 200 μ L de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 7 g de SDS e 50 mL de Na_2HPO_4 1 M em cada 100 mL de solução. Esta solução pré-aquecida a 58°C foi adicionada às membranas para serem então incubadas em um banho-maria com agitador (*Maxi-shake*, HETO) por 4 horas a 60 rpm. Após este período, esta solução foi descartada. A solução de hibridização tinha a mesma composição da solução de pré-hibridização, adicionada da sonda plasmidial. A sonda, previamente desnaturada a 94°C por 10 minutos, foi adicionada a solução de hibridização pré-aquecida a 58°C, na quantidade relativa ao número de membranas. As membranas foram incubadas à 58°C por 18 horas, em banho-maria com agitador a 60 rpm (*Maxi-shake*, HETO).

3.1.3 Obtenção e análise das imagens digitais

Após a hibridização, a solução foi descartada em recipiente adequado para materiais radioativos. As membranas foram então lavadas para a remoção do excesso de sonda. Foram realizadas duas lavagens em SSC 2X e SDS 0,1 % por 15 minutos a temperatura ambiente, seguidas de duas lavagens com SSC 1,5X e SDS 0,1 % por 15 minutos a 58°C (pré-aquecido). Por fim, as membranas foram lavadas duas vezes com SSC 0,5X e SDS 0,1 % por 15 minutos a 58°C (pré-aquecido).

Após as lavagens, as membranas foram expostas ao *Imaging Plate* (IP, KODAK) por 72 horas. O IP foi revelado utilizando o sistema de análise de imagens STORM 860 (GE HEALTHCARE). As imagens digitalizadas foram analisadas no programa *ArrayVision Evaluation* 6.0 (Copyright © IMAGING RESEARCH Inc. 2003) para a quantificação do sinal de hibridização emitido pelo *scanner*. Os valores das leituras dos sinais sem correção e os valores do

resíduo de fundo (*background*) produzido por este programa, foram utilizados para a análise estatística.

Após a revelação do sinal, a sonda foi retirada das membranas com uma solução de NaOH 0,4 N e SDS 0,1 %, a 65°C por 15 minutos por duas vezes, em banho-maria com agitador (*Maxi-shake*, HETO), seguida de mais duas lavagens em Tris 0,2 N, pH8,0, SDS 0,1 % e SSC 0.1X, de 15 minutos cada em temperatura ambiente. As membranas foram novamente expostas em IP por 24 horas, para verificar a ausência de sinal correspondente à completa remoção da sonda das membranas após lavagens. Quando não foram re-utilizadas imediatamente, as membranas foram mantidas úmidas a -20 °C.

3.1.4 Material biológico e extração de RNA total para a síntese das sondas de cDNA

O material biológico utilizado para a síntese das sondas de cDNA e hibridização dos microarranjos foi obtido a partir das aves desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC). O microarranjo foi utilizado para dois experimentos independentes. O primeiro deles visava determinar o padrão de expressão gênica na musculatura esquelética, cérebro, pele, coração e fígado. As amostras destes tecidos foram coletadas de nove aves de corte com 21 dias pós-eclosão. O material coletado devidamente identificado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado em freezer -80°C.

Amostras de musculatura peitoral também foram dissecadas a partir das aves das linhagens de corte e postura da Embrapa, a fim de identificar transcritos diferencialmente expressos entre linhagens divergentes quanto ao potencial de deposição de tecido muscular. Foram obtidas amostras de nove embriões no estágio HH35 (com 17 dias de desenvolvimento embrionário) para cada linhagem. Este estágio foi selecionado com base nos resultados obtidos em trabalhos anteriores, de quantificação do nível de expressão de genes associados ao desenvolvimento muscular, como MyoD, Myf5 e Pax3 (ALVARES et al, 2003, ALVES, 2004).

RNA total foi isolado destes tecidos utilizando-se o reagente Trizol (INVITROGEN), segundo protocolo adaptado de Chomczynski e Sacchi (1987). Aproximadamente, 200-300 mg de tecido congelado foram triturados em nitrogênio líquido e imediatamente dissolvidos em 1 mL de Trizol. Após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados às amostras. Após agitação vigorosa por 15

segundos, as amostras foram centrifugadas (12.000 x g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi transferido para tubos limpos e o RNA precipitado com 500 µL de álcool isopropílico. Após nova centrifugação, o RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75 % (em 25 % água DEPC – 0,01 % dietilpirocarbonato). As amostras foram novamente centrifugadas (7.500 x g, cinco minutos, 4°C) e, após remoção completa do etanol por secagem em bloco aquecedor a 37°C, o RNA total foi ressuscitado em água DEPC (0,01 %), normalmente em 20 µL. Uma alíquota de cada amostra foi separada para quantificação a 260 e 280 nm em espectrofotômetro e outra para visualização em gel de agarose 1 %, para a verificação da integridade do material extraído.

3.1.5 Síntese das sondas de cDNA para hibridização dos microarranjos

As sondas de cDNA foram sintetizadas segundo metodologia adaptada descrita por Hervé e colaboradores (1996). Em 30 µg de RNA total foram adicionados 156 pmoles de Oligo dT_{18V} (IMPRINT), a um volume final de 7,5 µL. As amostras foram aquecidas em bloco aquecedor a 75°C por 10 minutos e imediatamente incubadas no gelo. Para uma reação de volume final 36,5 µL foram adicionados 5 µL de *First Strand Buffer* 5x (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM, INVITROGEN), 2,5 µL de ditioneitol (DTT 100 mM, INVITROGEN), 40U de RNaseOUT (INVITROGEN), 2 µL de d(ATG) (10 mM cada), e 500 µCi de α³³P-dCTP (GE HEALTHCARE). Após aquecimento a 42°C por 5 minutos em bloco aquecedor, foram adicionadas 260U de *SuperScript™ II* RT (INVITROGEN) às amostras, seguida de uma leve agitação. Após 20 minutos de incubação a 42°C, 1,25 µL de dCTP (10 mM) foram adicionados às amostras e subsequentemente incubadas à 42°C por mais 60 minutos. Após este período, foi adicionado 2 µg de *polyadenylic acid Poly-A* (GE HEALTHCARE) e esta solução foi desnaturada a 94°C por 5 minutos no bloco aquecedor. A seguir, adicionou-se 1,12 µL de NaOH 4 M e incubou-se à 37°C por 15 minutos. Por fim, as amostras receberam 1,8 µL de HCl 4 M e 7 µL de Tris-HCl 1 M, pH 7,5. Para a purificação da sonda, o volume foi ajustado para 50 µL com água Milli-Q autoclavada. A purificação foi realizada em coluna *sephadex* G-50. Uma vez purificada, a sonda foi utilizada imediatamente.

3.1.6 Hibridização dos microarranjos com sondas de cDNA

A pré e a hibridização foram realizadas em garrafas de hibridização de 20 x 3,5 cm (WHEATON), sendo uma garrafa para cada membrana. Para a pré-hibridização utilizou-se 10 mL de uma solução contendo 2,5 mL de SSC 20X, pH 7,0, 0,2 mL de Tris-HCl 1 M, pH 7,5, 5 mL de formamida deionizada (GIBCO-BRL), 1 mL de *Denhardt's* (100X, INVITROGEN), 1 mL de SDS 10 % e 0,1 mL de esperma de salmão (10 mg/mL, GE HEALTHCARE), previamente desnaturado em bloco aquecedor a 94°C por 10 minutos. As membranas ficaram nesta solução por 2 horas a 42°C. Os 5 mL de solução de hibridização foram preparados com 1,25 mL de SSC 20X pH 7,0, 0,1 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 2,5 mL de formamida deionizada (GIBCO-BRL), 0,1 mL de *Denhardt's* 100X, 0,5 mL de SDS 10 %, 0,5 mL de sulfato de dextrano 50 % (GE HEALTHCARE). Esta solução foi pré-aquecida em forno de hibridização a 42°C (durante a pré-hibridização) e adicionada às membranas após descarte da solução de pré-hibridização. Foram adicionados 0,1 mL de esperma de salmão (10 mg/mL) à solução de hibridização, previamente desnaturado em bloco aquecedor a 94°C por 10 minutos, seguido da sonda, que foi adicionada após três minutos de desnaturação a 94°C em bloco aquecedor. A hibridização foi realizada em um período de 18 – 20 horas a 42 °C. A obtenção e análise das imagens digitais foram realizadas como descrito no item 3.1.3.

3.1.7 Análise estatística dos dados de expressão gênica

Para análise dos dados de expressão foi utilizado o programa estatístico SAS versão 8.0. A partir do delineamento experimental proposto, foi possível obter para cada transcrito transferido para o microarranjo um total de seis repetições dos dados de expressão: os genes foram transferidos em duplicata para a plataforma e foram hibridizados por três sondas por tratamento (tecidos e linhagens).

Os valores numéricos correspondentes às leituras dos sinais de hibridização foram analisados por um modelo de dois estágios proposto por Wolfinger e colaboradores (2001). No primeiro estágio, os dados de expressão foram ajustados para o modelo de normalização, com a correção para os efeitos a eles associados (animal, membrana, tratamento e gene), utilizando método de análise de variância (ANOVA) e o modelo de efeitos fixos (KERR; CHURCHILL,

2000; 2001; KERR et al., 2002). No segundo, os resíduos gerados no modelo de normalização foram ajustados segundo o modelo gene-específico. Assim, em um primeiro estágio foi ajustado o modelo de normalização dos dados, segundo a form. (1):

$$y_{iklm} = \mu + G_i + T_j + M_k + Q_{(k)l} + r_{ijklm} \quad (1)$$

Em que:

y_{iklm} é logaritmo na base dois da intensidade de sinal (expressão gênica); μ é uma constante associada a cada observação; G_i é o efeito do gene i ($i = 1, \dots, 4.534$); T_j é o efeito do tratamento j ($j = 1, \dots, 5$); M_k é o efeito aleatório da membrana k ($k = 1, \dots, 15$); $Q_{(k)l}$ é o efeito do quadrante l ($l = 1, \dots, 384$) dentro da membrana k , r_{ijklm} é o erro aleatório associado a cada observação. O efeito $Q_{(k)l}$ foi incluso para permitir o ajuste para efeito espacial na membrana. Neste modelo assume-se que M_k , $Q_{(k)l}$ e r_{ijklm} são iid $N(0, \sigma_k^2)$, $N(0, \sigma_Q^2)$, $N(0, \sigma_r^2)$ respectivamente e que ambos são independentes um do outro.

Em um segundo estágio um modelo de efeitos gene-específico foi ajustado a partir dos resíduos obtidos pelo ajuste do modelo de normalização, segundo a form. (2):

$$r_{gijk} = G_g + T_{(g)i} + M_{(gi)j} + e_{gijk} \quad (2)$$

Em que:

r_{gijkl} é o resíduo do modelo de normalização; G_g é o efeito médio do gene g ; $T_{(g)i}$ é o efeito do tratamento i dentro do gene g ; $M_{(gi)j}$ é o efeito da membrana j dentro do tratamento i e gene g e, e_{gijk} erro aleatório associado a cada observação. Neste modelo assume-se que M_k e e_{ijklm} são iid $N(0, \sigma_Q^2)$, $N(0, \sigma_e^2)$ respectivamente e que M_k e e_{ijklm} são independentes um do outro.

3.1.8 Análise de agrupamentos

Os dados de expressão obtidos para todos os 4.534 genes do microarranjo, referentes à abundância destes transcritos nos cinco tecidos avaliados e entre as linhagens, também foram utilizados para serem avaliados pelo programa *GeneSpring GX 7.3.1* (SILICON GENETICS), para uma análise de agrupamento. Este programa utiliza as médias de intensidade de sinal, corrigidas para *background*, para identificar e agrupar genes com padrão de expressão gênica similares entre os tratamentos testados. *K-means* foi o método utilizado neste estudo para a construção dos grupos (QUACKENBUSH, 2001).

3.1.9 Validação por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq)

O método de quantificação por transcrição reversa seguida da amplificação por PCR (RT-PCRq) foi utilizado para confirmar os dados de expressão gênica obtidos nos experimentos de hibridização dos microarranjos, porque é uma técnica que permite determinar a quantidade relativa de transcritos de um gene em uma amostra de cDNA, durante a fase exponencial de uma PCR (GIULIETTI et al., 2001).

As seqüências dos RNAm identificados como diferencialmente expressos nos ensaios de hibridização dos microarranjos foram utilizadas como molde para a obtenção dos iniciadores da reação de amplificação. Estas seqüências foram obtidas especificamente no banco *Gene* do *GenBank*, onde é possível localizar com precisão de pares de bases, a posição dos íntrons e dos éxons na seqüência de nucleotídeos dos RNAm (na página inicial do NCBI, buscar por um gene pelo nome ou número do *locus link* no banco *Gene*. Selecionar o gene para o organismo de interesse; no final da página, *display - gene table* indica a tabela com a estrutura íntron/éxon dos genes conhecidos). Os iniciadores foram desenhados a partir da seqüência molde utilizando-se o programa *Primer3* (PRIMER3). A estrutura éxon/íntron disponível permitiu confirmar que os iniciadores fornecidos pelo programa haviam sido sugeridos em éxons diferentes, assegurando assim, que apenas o cDNA fosse amplificado na reação de PCR. Os iniciadores obtidos foram ainda validados no programa *NetPrimer* (NETPRIMER) e por buscas no banco de seqüências *GenBank* por *Blast short* (BLAST), procurando assegurar que cada seqüência iniciadora era única para o gene alvo específico. Pares de iniciadores foram obtidos

para a β -actina, seis genes diferencialmente expressos entre os tecidos e oito entre as linhagens (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequências dos pares de iniciadores utilizados nas reações de RT-PCRq

Nome do gene	Locus Link	Pares de iniciadores sugeridos pelo Primer 3	Tamanho fragmento amplificado
β -actina		F: 5'-AATGAGAGGTTTCAGGTGCC-3' R: 5'-ATCACAGGGGTGTGGGTGTT-3'	
Genes diferencialmente expressos entre os tecidos			
Similar Laminina B1	LOC417698	F: 5'-GGCTACTCGGGCTTCTTCC-3' R: 5'-AGGCTTTTGGCATCTGTCTC-3'	296pb
Factor X regulador	HGNC9987	F: 5'-CCCTGAAGCACTCAAACACA-3' R: 5'-CGGCGTAGAGCAGAGGAG-3'	396pb
RGM-A	RGM-A	F: 5'-GGACTTTCACGGACACCTTC-3' R: 5'-AGCGTTGACCACCTCCTC-3'	395pb
Proteína 11 <i>Ring finger</i> (RNF11)	LOC424631	F: 5'-GAGCAAGTCCCCGTTCTC-3' R: 5'-GGTCCCCATACACAAAGTCC-3'	208pb
<i>Myeloid/lymphoid</i> MLLT6	MIM600328	F: 5'-GAGGCTGCTGTGTCTGTTCT-3' R: 5'-TTTCAGGGCTCCATCTTTGT-3'	212pb
CTL2	MIM606106	F: 5'-CCGATTTCTCCTCTTCCTC-3' R: 5'-ACGCCTCCTTGTTCTCTTC-3'	320pb
Genes diferencialmente expressos entre as linhagens			
<i>Syndecan 1</i>	LOC421136	F: 5'-CTGAGGGTCCTTCAATCCAA-3' R: 5'-GGACAGGCCTTTTGAACGTA-3'	187pb
Fator Rb-associado	LOC430671	F: 5'-TGCCTGAACTCTCACCTCT-3' R: 5'-GCACTTCTCCACCTCTGCT-3'	126pb
TPX2	LOC395081	F: 5'-AATCAAAAGAGAAGGGGCAA-3' R: 5'-CAAAAAGCAGAACCCGAATG-3'	156pb
<i>Tuberous sclerosis 2</i>	LOC429224	F: 5'-AGTGCTGGGAGGTTTGGTTT-3' R: 5'-GCAGAAGAAAGGCTGGATTG-3'	105pb
BOP1	Gga.4220	F: 5'-TTTCCACATCAACACGAAGG-3' R: 5'-TGGCGGATAGAGAGAGAAGG-3'	124pb
Fosfatase S/T 2A	LOC424734	F: 5'-AGGACACCAGCAAACCAAG-3' R: 5'-TGACTTTACAACAGGAGTGACAGA-3'	107pb
Proteína F-box 25	LOC421906	F: 5'-TCTCCCAAAGTGCAATAGCC-3' R: 5'-GCAGCCAAGAAAAGGAAGAA-3'	128pb

O RNA total isolado dos tecidos conforme descrito no item 3.1.4, foi convertido em cDNA fita simples, seguindo instruções do fabricante do *kit SuperScript First Strand Synthesis for RT-PCR* (INVITROGEN). Em 5 µg de RNA total foram adicionados 0,5 µg de oligo d(T) e 1 µL de dNTP mix (10 mM cada). Após incubação a 65°C por 5 minutos, as amostras foram imediatamente resfriadas em gelo. Foram então, adicionados 2 µL de RT buffer 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM, (INVITROGEN), 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 40U de RNaseOUT (INVITROGEN), em um volume final de reação de 20 µL. Após dois minutos de incubação à 42°C, foram adicionados 50U da enzima *SuperScript II RT* à reação. A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 50 minutos em bloco aquecedor, seguida da inativação da enzima por 15 minutos a 70°C. O RNA molde do híbrido RNA:cDNA foi removido com 2U de RNaseH por 20 minutos a 37°C.

As amostras de cDNA foram utilizadas para as reações de amplificação (PCR) em capilares de vidro do sistema *Light Cycler* (ROCHE), na presença de *SYBR green*. Cerca de 10 ng de cDNA foram utilizados em um reação de 20 µL de volume final contendo 0,8 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,25 µL de BSA (20 mg/mL, ROCHE), 0,4 µL de dNTP mix (10 mM), 4 µL de SYBR mix [para 50 µL: 25 µL de buffer de diluição de SYBR, 6,25 µL de DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, SIGMA), 0,5 µL de SYBR 10.000X em DMSO (MOLECULAR PROBES - INVITROGEN)], 1,5U de *Platinum® Taq DNA* polimerase (INVITROGEN) e 10 pmoles de cada um dos iniciadores. As condições de amplificação específica para cada par de iniciador obtido foram isoladamente definidas, levando-se em consideração a qualidade das curvas de *melting* obtidas (Tabela 2).

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001) foi utilizado para a quantificação relativa dos transcritos identificados como diferencialmente expressos selecionados para serem validados, tendo a β -actina como o controle constitutivo. $\Delta\Delta Ct$ foi calculado segundo a form. (3):

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{\text{transcrito alvo (tratamento 1)}} - Ct_{\beta\text{-actina (tratamento 1)}}] - (Ct_{\text{transcrito alvo (tratamento 2)}} - Ct_{\beta\text{-actina (tratamento 2)}}) \quad (3)$$

Onde:

Ct (do inglês, *threshold cycle*) corresponde ao ciclo da PCR no qual foi detectado o aumento na fluorescência reportada acima do sinal basal.

Tabela 2 – Condições estabelecidas para a amplificação dos transcritos por RT-PCR quantitativo

Gene	Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Número de ciclos
<i>β-actina</i>	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/5 seg	72°C/20seg	50
Similar Laminina B1	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/5 seg	72°C/20 seg	50
Fator X regulatório	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	62°C/5 seg	72°C/20 seg	50
RGM-A	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	61°C/5 seg	72°C/20 seg	50
Proteína <i>Ring finger 11</i>	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/5 seg	72°C/20 seg	50
<i>Myeloid/lymphoid</i>	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/5 seg	72°C/20 seg	50
<i>Syndecan 1</i>	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/8 seg	72°C/7 seg	50
Fator 600 Rb- associado	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/6 seg	72°C/6 seg	50
TPX2	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/7 seg	72°C/7 seg	50
Similar a <i>tuberous sclerosis 2</i>	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/7 seg	72°C/6 seg	50
BOP1	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/7 seg.	72°C/6 seg	50
Fosfatase S/T 2A	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	60°C/6 seg	72°C/7 seg	50
Similar a proteína F-box 25	95°C/10 min.	95°C/10 seg.	61°C/10 seg	72°C/8 seg	50

3.2 Ensaios de hibridização *in situ* (HIS) para RGM-A

Ensaios de hibridização *in situ* para a expressão de um gene particular consistem na detecção do respectivo RNA mensageiro por hibridização deste com uma molécula de RNA antisenso modificada (sondas). Para evitar degradação do RNA, reagentes e soluções utilizados para a HIS foram tratados com dietilpirocarbonato (DEPC, 0,01 %) e autoclavados. O protocolo empregado para a HIS segue o descrito por Mootoosamy and Dietrich (2002) e Álvares e colaboradores (2003).

3.2.1 Clonagem da ORF de RGM-A

A estratégia PCR-*nested* foi utilizada para obter a ORF completa do gene RGM-A utilizada neste estudo. A seqüência de número de acesso de AY128507 no *GenBank* foi utilizada como molde para a síntese dos dois pares de iniciadores necessários para esta estratégia de amplificação (RGM1 e RGM2). Para amplificar cerca de 20 ng de uma amostra de cDNA de musculatura esquelética, obtida conforme descrito no item 3.1.9, a primeira reação de amplificação utilizou 10 pmoles de cada um dos iniciadores RGM1, 2,5 µL de PCR buffer 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM), 1 µL de dNTP mix (10 mM cada), 1 µL de MgCl₂ (25 mM) e 2,5U de *Accuprime™ Taq DNA polimerase high fidelity* (INVITROGEN) em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador em 2 min a 94°C, 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C e com extensão final de 7 min a 72°C. A confirmação de amplificação de um fragmento único de aproximadamente 1.400 pb foi visualizada em gel de agarose 1 %. As mesmas quantidades de reagentes e condições foram utilizadas para uma segunda reação de amplificação de 5 µL do produto da primeira PCR a partir dos iniciadores internos (RGM2), posicionados próximos às regiões do códon de iniciação e de terminação da ORF. O fragmento único amplificado também foi confirmado em agarose 1 %.

A reação de ligação de 3 µL do produto da segunda PCR em 50 ng de pGEM-T (PROMEGA) foi realizada por 5U de T4 DNA ligase (INVITROGEN). Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, 1 µL da reação de ligação foi utilizada para a transformação de *E. coli* eletrocompetente (INVITROGEN) por eletoporação. A mini-preparação das colônias obtidas nesta transformação permitiu a verificação da presença da ORF completa de RGM-A no vetor pGEM-T por seqüenciamento.

3.2.2 Síntese da sonda de RNA antisense para RGM-A

Para gerar o DNA molde para a síntese de sondas de RNA antisense, fragmentos de RGM-A inseridos no pGEM-T foram amplificados por PCR, a partir dos iniciadores universais M13 e o *Thermoprime plus master mix* (ABgene), de acordo com as instruções descritas pelos fabricantes do kit. Para uma reação de amplificação de 10ng de DNA, a um volume final de 50 µL, foram adicionados 25 µL do *Thermoprime plus master mix* [0,025 U/µL

de *Thermoprime plus DNA polimerase*; Tris-HCl 75 mM, pH 8,8; (NH₄)₂SO₄ 20 mM; 0,01 % Tween-20; 200 µM de cada dNTP; MgCl₂ 1,5 mM], 2 µL de DMSO e 10 pmoles de cada iniciador M13 universal. A amplificação do molde em termociclador ocorreu em 1 min a 95°C, cinco ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 65°C e 2 min a 72°C, 25 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 50°C, 2 min a 72°C e uma extensão final de 6 min a 72°C. Esta estratégia de amplificação do molde assegura que o sítio de ligação para a RNA polimerase específica para a obtenção do antisenso esteja próxima do produto da PCR. Depois de confirmada a qualidade em gel de agarose 1 %, o produto da PCR foi purificado em colunas do kit *Quiaquick PCR purification kit* (QUIAGEN), seguindo protocolo descrito pelos fabricantes, e estocadas em freezer -20°C.

A posição das extremidades 3' e 5' de RGM-A no pGEM-T (identificada por seqüenciamento) estabeleceu que as sondas de RNA antisenso seriam obtidas nesta construção a partir do promotor T7, porque estava localizado próximo à extremidade 3' do gene. Assim, para uma reação de 40 µL de volume final foram adicionados aos 3 µL de PCR molde, 8 µL de buffer 5x da RNA polimerase (Tris-HCl 200 mM, pH 7,9; MgCl₂ 30 mM; *spermidine* 10 mM; NaCl 50 mM), 4 µL de DTT 0,1 M, 2 µL de *DIG labelling mix* (ROCHE), 20U de *RNase inhibitor* (PROMEGA) e 20U da T7 RNA polimerase (PROMEGA). A reação foi incubada por duas horas a 37°C. Verificada a eficiência da transcrição *in vitro* em gel de agarose 1 %, 20U de *DNase I*, *free RNase* foram adicionadas às sondas, para a remoção do DNA molde. Após 15 minutos de incubação em banho a 37°C, as sondas foram purificadas em colunas apropriadas (SIGMA) segundo protocolo descrito pelos fabricantes. As sondas foram então diluídas com água DEPC para 1 µg/uL e estocadas em -20°C.

3.2.3 Coleta e preparação dos embriões para HIS

Os ovos de frango fertilizados foram mantidos em uma incubadora úmida a 38°C. Os estádios de desenvolvimento dos embriões desejados foram obtidos segundo Hamburger e Hamilton (1951), modificado por Christ e Ordahl (1995) e Porquié (1999). Os embriões foram coletados em tampão fosfato salino (PBS) tratado com DEPC, dissecados livres das membranas extra-embrionárias, e fixados em 4 % paraformaldeído (PFA) em PBS, a 4°C, *overnight*. Cavidades como vesícula cerebral e coração foram perfuradas para permitir livre troca de reagentes.

Os embriões fixados foram organizados em placas de 48 poços por estágio do desenvolvimento. Inicialmente, os embriões foram lavados por duas vezes em PBT (500 mL de PBS e 500 µL de Tween-20), de cinco minutos cada, em agitador, para a remoção do PFA 4 %. Em seguida, os embriões foram desidratados em uma série ascendente de metanol/PBT (25 % MeOH/PBT, 50 % MeOH/PBT, 75 % MeOH/PBT, MeOH 100 %, cinco minutos cada), descorados por uma hora em 6 % H₂O₂/MeOH e mantidos *overnight* em MeOH, em freezer -20°C. No dia seguinte, os embriões foram re-hidratados utilizando uma série descendente de metanol/PBT (75 % MeOH/PBT, 50 % MeOH/PBT, 25 % MeOH/PBT, cinco minutos cada) e lavados duas vezes em PBT por cinco minutos.

3.2.4 Hibridização *in situ*

Após a re-hidratação, os embriões foram submetidos a três lavagens em uma solução detergente (IGEPAL 1 %, SDS 1 %, *Deoxycholate* 0,5 %, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM e NaCl 150 mM) para tornar os embriões permeáveis às sondas e ao anticorpo anti-DIG. Os embriões foram então re-fixados em 4 % PFA em PBS por 20 minutos. Após sucessivas lavagens em PBT, os embriões foram colocados em 50 % solução de pré-hibridização [50 % formamida, SSC 5x pH 4,5, 2 % SDS, 2 % reagente bloqueador, 250 µg/mL RNA (ROCHE) e 100 µg/mL de *Heparin*] em PBT, lavados com solução de pré-hibridização e então, incubados em solução de pré-hibridização por uma hora em banho a 70°C. Esta solução foi substituída pela solução de hibridização, que correspondia à solução de pré-hibridização com a sonda adicionada pré-aquecida a 70°C a uma concentração final de 10 µg/mL. Após hibridização *overnight* a 70°C, os embriões foram lavados cinco vezes em solução X (formamida 50%, SSC 2x pH 4,5 e SDS 1 %), por 30 minutos cada, em banho a 70°C. Posteriormente, os embriões foram submetidos a duas lavagens em MABT (ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM, 0.1 % Tween-20, pH 7,5) de 30 minutos cada.

Para prevenir ligação inespecífica do anticorpo anti-DIG, os embriões foram incubados por uma hora em 2 % reagente bloqueador (ROCHE) em MABT, seguida de outra incubação de uma hora em 2 % reagente bloqueador, 20 % *Goat serum* (INVITROGEN) em MABT. O anticorpo anti-DIG acoplado a fosfatase alcalina foi diluído em 1:2.000 em 2 % reagente bloqueador, 20 % *Goat serum* em MABT e adicionado aos embriões para incubação a

4°C em uma plataforma de agitação, *overnight*. No dia seguinte, os embriões foram lavados em MABT por oito horas, trocando-se por solução nova a cada hora.

Uma reação enzimática foi realizada a fim de visualizar a região no embrião onde a sonda DIG-marcada, agora ligada ao anticorpo anti-DIG, hibridizou ao RNA mensageiro. Para isso, os embriões foram incubados em solução NTMT (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9,5, MgCl₂ 50 mM, 1 % Tweed-20, Levamisol 2 mM). Após 40 minutos, NBT e BCIP, substratos para a fosfatase alcalina, foram adicionados a solução de NTMT a uma concentração final de 1 µg/mL. Neste momento, os embriões foram incubados no escuro e a reação de coloração monitorada a cada meia hora. Depois de atingida a intensidade de coloração desejada, os embriões foram lavados em PBT e fixados em 4 % PFA em PBS *overnight*. Por fim, os embriões foram estocados em 80 % glicerol em PBS, após lavagens em glicerol 20 %/PBT e glicerol 50 %/PBT.

3.2.5 Foto-microscopia

Os embriões inteiros foram montados em slides com o lado direito voltado para cima. Embriões mais velhos foram divididos ao meio para permitir uma melhor visualização da expressão nos somitos. Os embriões foram examinados em um microscópio (*Zeiss Axioskop 2*, ZEISS). Imagens digitais foram capturadas pela *Zeiss AxioCam digital camera* (IMAGING ASSOCIATES). As imagens digitais de cada uma das camadas fotografadas foram montadas em Adobe *Photoshop* versão 7.0 (PHOTOSHOP).

3.2.6 Cortes transversais

Registrado o padrão de expressão do RGM-A no embrião inteiro para todos os estádios, os embriões em 80 % glicerol/PBT foram re-hidratados com PBS e incubados em 20 % gelatina a 50°C em banho-maria por 30 minutos. Aproximadamente 0.5 mL de 20 % gelatina em PBS foi pipetado em um molde, para onde foram transferidos os embriões do banho-maria. Neste molde, os embriões foram orientados para permitir os cortes transversais imediatamente antes de a gelatina solidificar. Após dez minutos a 4°C, os blocos de gelatina foram removidos do molde, cortados em forma de cubos e fixados em um grande volume de 4 % PFA em PBS por no

mínimo quatro dias a 4°C. Os blocos de gelatina foram lavados em PBS para remover traços do agente fixador e cortados a cada 50 µm em vibrátomo (Pelco 1000, AGAR SCIENTIFIC). Os cortes foram arranjados em slides de microscópio, cobertos com 80 % glicerol em PBS e lamínula. Os cortes transversais foram fotografados em microscópio.

3.3 Eletroporação *in ovo*

3.3.1 Sub-clonagem de RGM-A em pCA β -IRES-eGFP

Para a super-expressão de RGM-A nos somitos dos embriões de frango, uma construção baseada em plasmídeo bicistrônico foi utilizada (pCAB-RGM-A-IRES-eGFP). Esta construção tem a β -actina de frango como promotor e o *enhancer* CMV, os quais permitem a expressão constitutiva dos genes inseridos no sítio de clonagem. O sítio de clonagem é seguido pelo sítio interno de entrada do ribossomo (IRES, *internal ribosomal entry site*) e pela ORF para a proteína fluorescente verde derivada de água viva (eGFP), antes de terminar com um códon de parada da transcrição e um sítio poli(A). Sendo assim, a transcrição da construção permite a formação de um RNA mensageiro bicistrônico, com duas proteínas individuais, o gene e eGFP. A fluorescência é então marcador para o sítio e o nível de expressão ectópica do gene. A construção controle (IRES – eGFP) contém apenas a seqüência promotora/enhancer, IRES e a ORF para eGFP (ITASAKI et al., 1999; ALVARES et al., 2003).

Antes de introduzir a ORF de RGM-A, clonada em pGEM-T, no vetor de expressão pCA β , foi necessário realizar um passo de clonagem intermediária em pSLAX12 para poder corrigir a presença de dois códons ATGs presentes na seqüência do iniciador direto RGM2. Inicialmente, a construção RGM-A/pGEM-T foi utilizada em uma reação de digestão na presença das enzimas *NcoI* e *EcoRI*. A banda de 1.400 pb correspondente ao fragmento de RGM-A inserido no pGEM-T foi extraída do gel de agarose seguindo instruções do *Quiaquick gel extraction kit* (QUIAGEN). Cerca de 3 µL do fragmento RGM-A *NcoI-EcoRI* produto desta extração foi inserido em 50 ng de pSLAX12 em uma reação de ligação contendo 5U de T4 DNA ligase. A reação de ligação ocorreu em 10 minutos em temperatura ambiente e 3 µL da ligação foi utilizada para uma transformação por choque térmico. O DNA da construção RGM-A/pSLAX12 foi obtido por mini-preparação seguindo instruções do kit *Miniprep Quiagen*

(QUIAGEN) e digerido pelas enzimas *ClaI-EcoRI*. A banda correspondente ao fragmento RGM-A *ClaI-EcoRI* foi extraída do gel de agarose (QUIAGEN kit) e 5 μL do produto desta extração foi utilizado em uma reação de ligação em 300 ng de pCAB *ClaI-EcoRI* por 5U de T4 DNA ligase. A transformação por choque térmico de 3 μL da reação de ligação em *E. coli* competente resultou em colônias que continham a construção correta pCAB-RGM-A-IRES-eGFP. Uma colônia foi inoculada *overnight* a 37°C em 200 mL de LB e 200 μg de ampicilina. Uma Mega-Prep foi realizada seguindo as instruções do fabricante do *QIAfilter plasmid maxi kit* (QUIAGEN), a fim de obter o DNA da construção de expressão em uma concentração superior a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, necessária para uma eletroporação eficiente.

3.3.2 Eletroporação

Os embriões utilizados para a eletroporação estavam entre os estágios HH16 e HH17. Inicialmente, 2 mL de albumina foram removidos e uma janela (de 1-2 cm) foi aberta na casca do ovo. Para a visualização do embrião, tinta nanquim (Índia ink, PELIKAN, diluição 1:10 em PBS contendo penicilina-streptomicina) foi injetada em baixo da blastoderme. Para futura incubação, várias gotas de PBS/Penicilina/Streptomicina estéril foram adicionadas ao embrião, seguido do fechamento da janela na casca com fita adesiva transparente.

O protocolo de eletroporação segue o descrito por Alvares e colaboradores (2003). A construção controle (pCAB- eGFP) e a de expressão pCAB-RGM-A-IRES-eGFP, misturados ao corante *Fastra Green*, foram injetados sob pressão dentro dos somitos epiteliais I – IV recentemente formados. Para a injeção das construções, utilizou-se o equipamento chamado *PV 820 Pneumatic PicoPump (WPI)*. O eletrodo positivo (anodo) foi posicionado lateralmente ao somito injetado e o positivo (catodo), depois de flambado, foi colocado dentro do tubo neural dorsal, também próximo ao somito injetado. Aproximadamente três pulsos retangulares de 18V por 3 - 5 ms foram administrados para cada somito injetado, utilizando-se do *Intracel TSS10 (Intracel)*.

Após o procedimento de eletroporação, os embriões foram selados e re-incubados por 24 e 48 horas. Os embriões foram então coletados e a eficiência da eletroporação foi verificada em microscópio de fluorescência. Os embriões com quantidades suficientes de eGFP foram fixados em PFA 4 % *overnight*. Os efeitos da super-expressão de RGM-A nos somitos dos

embriões transformados foram avaliados por HIS. O lado não-transformado dos embriões foi utilizado como controle da eletroporação. Os marcadores Myf5, BMP1b, Pax3 e EphA4 foram utilizados para a síntese de sondas de RNA antisense, obtidas seguindo protocolo descrito no item 3.2.2, obedecendo os promotores corretos para cada construção. As HIS e a documentação por foto-microscopia foram realizadas como descrito nos itens 3.2.4 e 3.2.5 anteriormente.

4 Resultados e Discussão

4.1 A seleção dos transcritos para a construção do microarranjo

Para a construção do microarranjo utilizado neste estudo foi inicialmente necessário identificar os transcritos associados ao sistema muscular que seriam estudados e também obter a seqüência ou os clones contendo estas seqüências de cDNA dos transcritos de interesse. A coleção de 13.664 ESTs de frango obtida em trabalhos anteriores (JORGE et al, 2004; ALVES, 2004, comunicação pessoal, C.S.S. CASSOLI) permitiu a construção da plataforma microarranjo utilizada neste trabalho. A montagem destas ESTs pelo programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999), resultou em 1.781 agrupamentos de seqüências (também chamados *clusters*) e em 4.963 seqüências simples (ou *singlets*). Dessa forma, 6.744 seqüências únicas (soma dos *contigs* com os *singletons*) foram obtidas e consideradas os transcritos do banco total de ESTs construído. Foram descartados todos os *singletons* provenientes das bibliotecas de hipófise e hipotálamo formados a partir deste agrupamento. Do conjunto restante, foi selecionado para o microarranjo um clone representante de cada seqüência única, desconsiderando a possibilidade de existência de duas ou mais seqüências únicas representando um mesmo gene/transcrito. Deste modo, foram selecionados todos os *singletons* obtidos e uma seqüência representativa de cada *contig*. O critério de seleção desta seqüência representativa dentro dos *contigs* foi optar por aquela maior em extensão. Como a média de tamanho de inserto foi de aproximadamente 1 kb e os cDNAs foram sintetizados a partir da cauda poli(A) por oligo d(T), acreditou-se que os clones maiores também continham a maior parte da seqüência codificadora do gene. Como resultado deste processo, 4.283 seqüências únicas foram selecionadas para serem representadas na plataforma microarranjo construída. Em adição, dois clones contendo a seqüência para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), três para β -actina e um contendo apenas o vetor pSPORT1 (INVITROGEN) foram ainda selecionados para preencherem 251 espaços do microarranjo e serem utilizados como controles positivos e negativos. Dessa forma, o microarranjo foi construído com um total de 4.534 clones, que foram transferidos em duplicata para as membranas de náilon.

Uma estrutura de bioinformática foi criada para dar suporte ao banco de ESTs e contribuiu para a identificação e análise dos transcritos selecionados para o microarranjo. Como

padrão, todas as seqüências únicas geradas pela montagem foram comparadas com o banco não redundante do *GenBank* utilizando o programa BlastX e BlastN (BLAST) para comparar com o banco de ESTs de frango e humanos. Estas seqüências foram ainda anotadas segundo a função biológica, seguindo as categorias propostas pelo *Gene Ontology* (GENEONTOLOGY). As ESTs de *Gallus gallus* analisadas pelo *The Institute for Genome Research* (TIGR) também foram adicionadas ao sistema, a fim de permitir um aprimoramento da anotação funcional. Estas ESTs podem ser encontradas no *gene index* (GgGI) e são fornecidas como um TIGR *consensus* (TC), que corresponde a um identificador da seqüência e da anotação do TIGR. Todas estas informações funcionais estão armazenadas em um banco de dados próprio, por enquanto disponível sob acesso restrito. Este suporte técnico foi fundamental para agilizar as análises de um grande volume de dados gerados pelo seqüenciamento de ESTs e expressão diferencial por microarranjos, permitindo o acesso da seqüência e da anotação correspondente a partir do nome do clone. Todas as seqüências obtidas nas bibliotecas de cDNA, inclusive aquelas empregadas neste microarranjo, estão disponíveis para livre acesso no *GenBank* (NCBI), assim como os clones, para serem utilizados para fins científicos.

4.2 Resultados da hibridização com a sonda plasmidial e correção para a quantidade de DNA impressa nos microarranjos

Os microarranjos utilizados neste estudo foram construídos a partir da transferência das culturas de bactérias contendo os insertos dos transcritos de interesse para as membranas de náilon. Estas membranas foram colocadas sob uma placa com meio de cultura apropriado e incubadas por oito horas para o crescimento das colônias. Portanto, a quantidade de DNA impressa nos microarranjos foi determinada pela taxa de crescimento destas colônias durante este período de incubação. Como o crescimento de todas as colônias não é um processo homogêneo e controlável, foi necessário utilizar uma sonda plasmidial para conferir a quantidade de DNA obtida para cada transcrito ao final do período de incubação e construção dos microarranjos. Os valores de intensidade de sinal obtidos com a hibridização com esta sonda indicaram uma nítida variação na quantidade de DNA para cada transcrito impresso nos microarranjos (Figura 4). Como a variação em quantidade foi aparente, todos os microarranjos que foram utilizados neste estudo foram inicialmente hibridizados com esta sonda plasmidial e os

valores de intensidade de sinal obtidos foram utilizados para uma correção dos valores obtidos com as sondas de cDNA dos tecidos, para a correta inferência do nível de expressão dos transcritos entre os tratamentos testados.

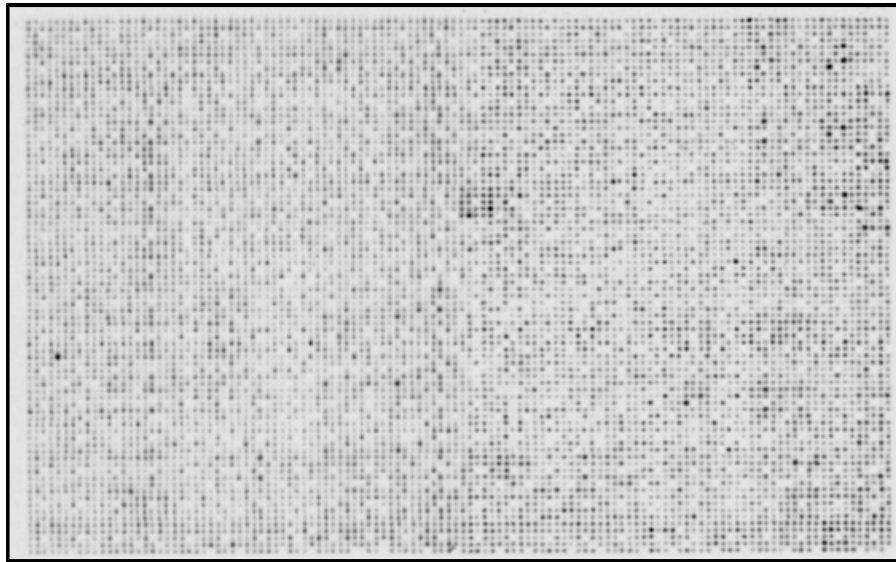


Figura 4 - Microarranjo hibridizado com a sonda plasmidial para a determinação da quantidade de DNA impressa nas membranas

4.3 As estatísticas de desempenho dos microarranjos

O estabelecimento de uma metodologia confiável para determinar a expressão de inúmeros transcritos por microarranjos exigiu que o grau de reprodutibilidade e de sensibilidade da plataforma construída também fossem avaliados. O grau de reprodutibilidade indicou a capacidade do microarranjo em repetir os dados de intensidade de sinal em hibridizações diferentes nas triplicatas das sondas de cDNA (repetições técnicas). A sensibilidade indicou o nível de diferença de expressão, representada pelo sinal de hibridização, detectável pelo microarranjo.

A reprodutibilidade do sistema foi investigada pela comparação das intensidades de hibridizações dos microarranjos entre as repetições das sondas de cDNA para o mesmo tecido. Gráficos do tipo *Box plot* (Figura 5) permitiram verificar os valores discrepantes entre e dentro das repetições técnicas. Em geral, o grau de reprodutibilidade dos transcritos foi semelhante,

como pôde ser observado (pelos pontos em amarelo) entre as repetições técnicas das sondas de “coração”, “musculatura esquelética” e “pele” (Figura 5). No entanto, GAPDH não revelou ser um controle positivo eficiente, uma vez que não houve reprodutibilidade entre as repetições técnicas (pontos verdes no gráfico da Figura 5). A β -actina (pontos em vermelho) apresentou um padrão mais homogêneo de reprodutibilidade entre as repetições e entre os tratamentos utilizados e, por isso, foi o controle positivo selecionado para a determinação do nível de expressão dos ensaios deste estudo.

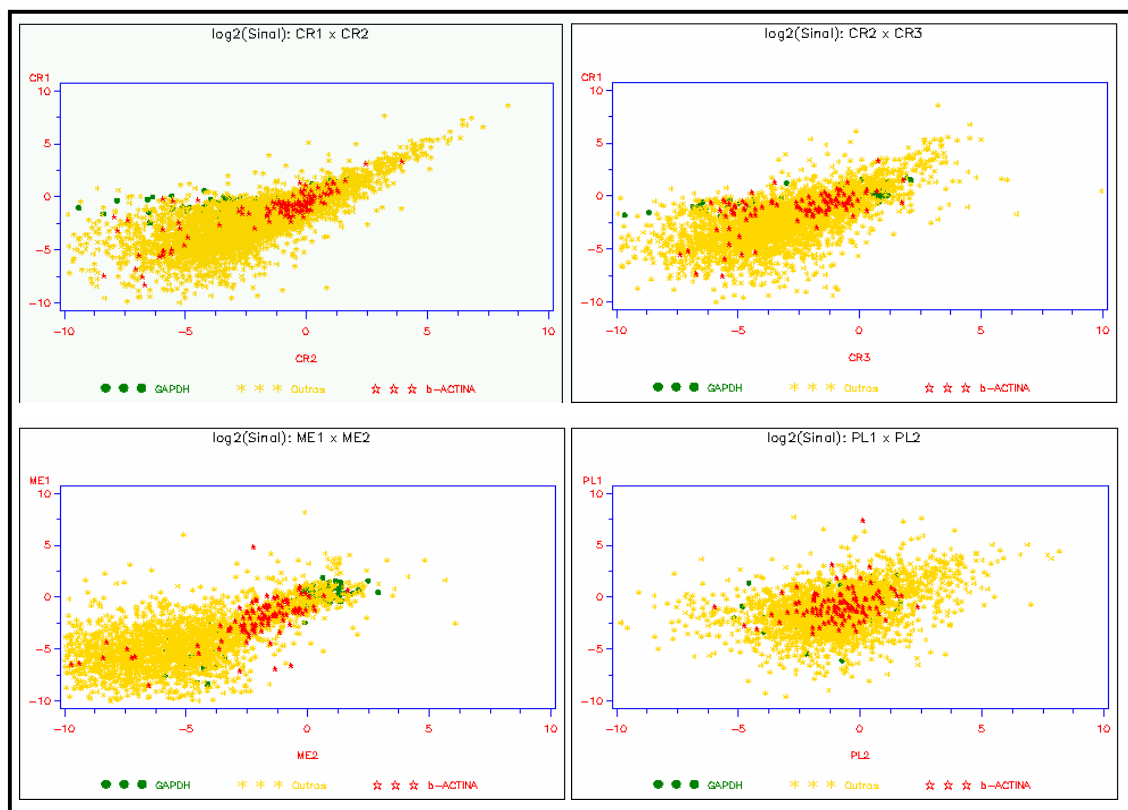


Figura 5 - Intensidade de sinal [em escala logarítmica na base 2 (\log_2)] de repetições das sondas de cDNA. Acima, repetições das sondas de cDNA de “coração” (CR1 x CR2; CR2 x CR3); abaixo e à esquerda, repetições de sondas de “musculatura esquelética” (ME1 x ME2) e à direita, de “pele” (PL1 x PL2). Os pontos em vermelho correspondem às repetições do controle positivo β -actina; em verde, GAPDH e em amarelo, as repetições das intensidades de sinal dos transcritos do microarranjo

Os valores de médias e variâncias esperados foram utilizados para inferir o grau de sensibilidade do microarrajo, sugerindo o número de repetições necessárias para detectar transcritos diferencialmente expressos. A média dos componentes de variância e o erro foram utilizados para o cálculo do poder de teste para diferentes combinações de número de membranas (M) e de *spots* (S, clone transferido) dentro de membrana. Foi possível observar que quando a diferença entre tratamentos foi pequena (menor que 4 vezes) o poder de teste foi baixo ($> 0,35$), independente do número de membranas e *spots* dentro membrana. Quando a diferença entre tratamentos foi de 4 vezes, o poder ainda foi baixo (aproximadamente 0,35) com 3 M e 2 S. Contudo, com 6 M e 4 S o poder de teste atingiu, aproximadamente 0,9. Este valor de poder de teste também foi atingido com 3 M e 2 S quando a diferença entre tratamentos foi de 8 vezes. Estes resultados do cálculo do poder de teste indicaram que a detecção de diferenças pequenas em expressão entre tratamentos exigiria pelo menos seis repetições de hibridização das membranas. Resultados semelhantes foram observados por outros pesquisadores (WOLFINGER et al, 2001). Os microarranjos utilizados neste estudo continham os transcritos em duplicata (2 S) e três repetições das sondas nas membranas (3 M) foram realizadas, indicando, portanto, que apenas diferenças entre sinais de hibridização maiores do que oito vezes (entre transcritos no microarrajo) foram detectáveis (Figura 6).

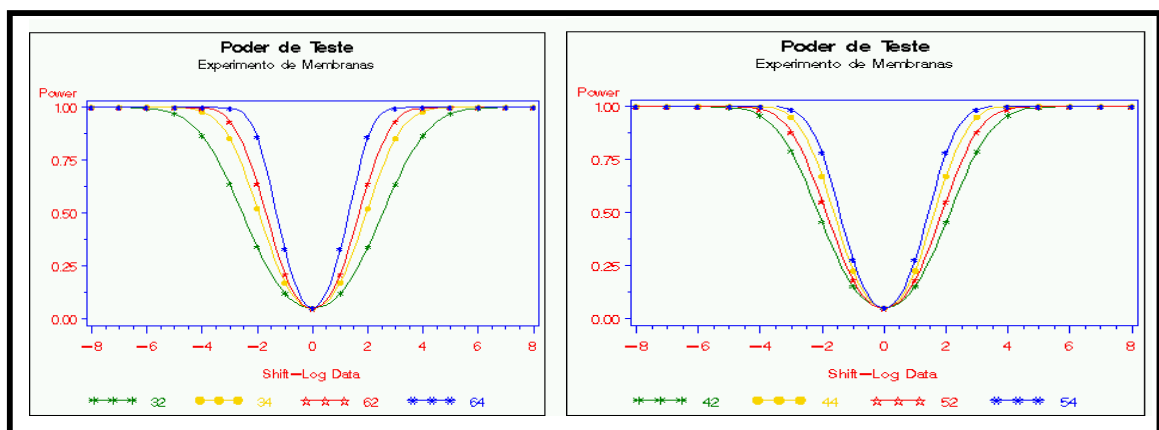


Figura 6 - Poder de teste. À direita, linha verde representa o poder de teste para três membranas (3 M) e dois *spots* (2 S); amarela, 3 M e 4 S; vermelha, 6 M e 2 S e azul, 6 M e 4 S. À esquerda: a linha verde representa o poder de teste para 4 M 2 S; amarela, 4 M e 4 S; vermelha, 5 M e 2 S; azul, 5 M e 4 S. Note que as diferenças estão em escala \log_2

4.4 Identificação de transcritos diferencialmente expressos na musculatura peitoral entre linhagens de frango selecionadas para corte e postura

Os programas de melhoramento genético de aves para a produção de carne e de ovos resultaram em linhagens diferentes quanto ao potencial de deposição muscular. Fenotipicamente, as linhagens comerciais selecionadas para crescimento rápido, por características como peso e rendimento de carcaça, apresentam maior número de fibras musculares em relação às aves selecionadas para postura de ovos. Isto foi observado no músculo *semimembranosus* e *latissimus dorsi* (BURKE; HENRY, 1997; REMIGNON et al., 1995) e no músculo *pectoralis*, com aves de corte apresentando o dobro de fibras musculares em relação às de postura (SCHEUERMANN et al., 2004). Estas diferenças em quantidade de massa muscular entre linhagens de aves podem ser observadas desde os estádios embrionários do desenvolvimento (ALVES, 2004). No entanto, poucos fatores genéticos específicos foram identificados até o momento, com associação direta às diferenças nas taxas de crescimento, incluindo qualquer um que possa explicar o aumento em massa muscular em animais domésticos (MOTT; IVARIE, 2004).

A expressão diferencial de transcritos da musculatura esquelética foi utilizada neste estudo com o objetivo de procurar compreender em nível molecular, estas diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens de corte e postura frango. Amostras de musculatura peitoral de embriões de frango de corte e de postura da Embrapa, ambas com 17 dias de desenvolvimento embrionário (HH35), foram utilizadas para a prospecção de um microarranjo, com o objetivo de identificar transcritos candidatos associados às diferenças de crescimento e de potencial de deposição muscular entre linhagens de frangos. Dos 4.534 transcritos presos ao microarranjo utilizado, 98 foram identificados como diferencialmente expressos entre as musculaturas esqueléticas das linhagens ($P < 0,05$) (Tabelas 3 e 4). Um trabalho similar foi realizado por Mott e Ivarie (2004), com o objetivo de identificar transcritos diferencialmente expressos entre embriões de linhagens de codornas também com potenciais de crescimento diferentes. O microarranjo contendo 4.704 clones de cDNA forneceu três transcritos diferencialmente expressos (MOTT; IVARIE, 2004).

Dos 98 transcritos candidatos selecionados, 61 tinham maior expressão na musculatura esquelética das aves da linhagem de corte, em relação aos níveis correspondentes

quantificados nas de postura (Tabela 3). As seqüências de nucleotídeos desses RNA mensageiros foram comparadas com a seqüência do genoma do frango, disponível no NCBI, para a localização dos locos transcritos e predição das funções biológicas. Como foram identificadas na linhagem selecionada para crescimento, estas informações foram somadas na tentativa de localizar entre estes candidatos, aqueles mais provavelmente envolvidos com os mecanismos de crescimento e desenvolvimento muscular.

O crescimento e a deposição muscular são determinados por uma conexão complexa entre programas reguladores executados por fatores de transcrição e vias de transdução de sinal, ativados por fatores de crescimento e hormônios (KUNINGER et al., 2004). Membros destas vias de comunicação celular em resposta a sinais proliferativos de fatores de crescimento e de hormônios foram identificados entre os 61 transcritos altamente expressos na musculatura de aves de corte. *Syndecan 1* (LOC421960), por exemplo, é precursor de um receptor de membrana para sinais de adesão celular (HAYASHI et al., 1987) e a fatores de crescimento (MALI et al., 1993; KATO et al., 1998). Também foi identificada como altamente expressa nesta linhagem, uma proteína adaptadora a receptores de fatores de crescimento (*growth factor receptor bound protein 10*, LOC420948). Esta proteína adaptadora foi associada a receptores de insulina e ao receptor para o fator de crescimento similar à insulina do tipo 1 (IGF I), e descrita como reguladora do processo proliferativo, ora atuando como ativadora do processo mitogênico (WANG et al., 1999), ora como inibidora (DUFRESNE; SMITH, 2005). *Tuberin* ou *Tuberous sclerosis 2* (LOC416552), também identificado neste grupo, foi associado à regulação do crescimento celular induzida por hormônios esteróides (FINLAY et al., 2004).

Os sinais extracelulares recebidos por estes receptores de membrana são transmitidos ao núcleo celular por um elaborado sistema de sinalizadores intracelulares. Interessantemente, estes foram os transcritos mais freqüentes identificados como altamente expressos na musculatura esquelética das aves selecionadas para crescimento rápido. Entre eles, a cinase de proteína *serine threonine protein kinase* MASK (LOC422231), que atua na ativação da cinase mitogênica MAP4K (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase*) (DAN; WATANABE; KUSUMI, 2001). A proteína CHML (LOC 422266), também conhecida como *choroideremia-like* ou *Rab escort protein 2*, é um sinalizador intracelular do tipo Rab3A *guanine nucleotide dissociation inhibitor* (GDI) (ANDRES et al., 1993), com fenótipo de atraso no crescimento embrionário em camundongos transgênicos CHML-nulos (YAEKURA et al., 2003).

A fosfatase conhecida como *serine threonine phosphatase 2A* (PPP2R1A) atua na regulação da via de sinalização do metabolismo da insulina (UGI et al., 2004). Outros dois sinalizadores de vias metabólicas foram *Psph A protein* (LOC417543), uma fosforilase kinase muscular associada ao metabolismo do glicogênio (WEHNER; KILIMANN, 1995) e *AMP activated protein kinase* (Gga.8821), associada ao metabolismo de colesterol e ácidos graxos (THORNTON; SNOWDEN; CARLING, 1998).

Transcritos associados ao metabolismo energético da célula também foram frequentes como altamente expressos na musculatura das aves de maior potencial de crescimento. Entre eles, foram identificados Acetil CoA transferase (LOC426847), que atua no metabolismo de ácidos graxos (na degradação β -oxidativa dos ácidos graxos); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), do metabolismo de carboidratos (glicólise); citocromo c oxidase (LOC415826) e citocromo c reductase (LOC415752), ambas da cadeia respiratória atuando na fosforilação oxidativa; glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase 2 (LOC416372) e UDP-galactose epimerase (LOC419686), ambas associadas ao metabolismo de carboidratos.

Alterações no nível de expressão de genes associados a estas categorias de sinalização celular e metabolismo energético, também foram observadas com a administração de hormônios ativadores de metabolismo energético na musculatura esquelética de humanos. Viguerie e colaboradores (2004) administraram epinefrina em humanos, um hormônio de resposta ao estresse e também envolvido com processos metabólicos no músculo, e observaram que este hormônio alterava a expressão de genes envolvidos com a via de sinalização dependente de AMP cíclico e de genes associados ao metabolismo de glicose e de lipídios. O hormônio da tireóide, também administrado à musculatura esquelética, induziu alterações na expressão de genes associados ao metabolismo energético mitocondrial (CLEMENT et al., 2002). A insulina influenciou genes associados ao balanço energético, disponibilidade de substrato e atividade mitocondrial (ROME et al., 2003). Além de dar suporte às categorias indicadas neste estudo, estes resultados corroboraram para indicar os transcritos das vias de sinalização celular e de metabolismo energético como os alvos preferenciais da seleção genética de animais para crescimento rápido.

Reguladores do ciclo celular também foram identificados entre os altamente expressos na musculatura peitoral de aves de corte. TPX2 (LOC415270), por exemplo, é uma proteína associada a microtúbulo com expressão restrita em células proliferativas. Durante a

mitose, é ativada por fosforilação de uma maneira microtúbulo-dependente, e parece atuar sobre a organização dos pólos durante a divisão celular (HEIDEBRECHT et al., 1997; WITTMANN et al., 2000). O fator 600 associado ao retinoblastoma também é um regulador do ciclo celular, que atua promovendo a saída irreversível do ciclo e manutenção do estado pós-mitótico para permitir o início do programa de diferenciação, especialmente o muscular (SCHNEIDER et al., 1994; CAMARDA et al., 2004). *Sepitin* (LOC424843), da família de proteínas de ligação a GTP-polimerizadoras, também atua durante o processo mitogênico, montando a estrutura mitótica organizadora da citoquinase e da separação dos cromossomos durante a divisão celular (SPILOTIS; KINOSHITA; NELSON, 2005). Ainda foram indicados como diferencialmente expressos algumas proteínas ribossomais (L15, L53, S14, L7a, S25 e S30) e proteínas com capacidade de ligação à molécula de DNA, que atuam na regulação da expressão gênica, como as da família das histonas, Histona deacetilase 10 (LOC417742), Histona 3.3 (LOC428560) e uma Histona chaperona envolvida com o silenciamento gênico (LOC423892), e proteínas hipotéticas com domínios *zinc finger* 650 e 644 e *CCCH-type*.

Poucos transcritos associados à sinalização a fatores de crescimento foram identificados entre os 37 com maior expressão na linhagem de aves selecionadas para a postura de ovos, de menor potencial de crescimento e deposição muscular (Tabela 4). O fator de resposta ao butirato (LOC428877) que foi identificado, é uma proteína com domínio *zinc finger* 36 *CCCH-type* membro da família TIS11 de fatores de resposta a fatores de crescimento (BUSTIN et al., 1994). A proteína F-box 25 (LOC421906) também foi identificada como altamente expressa na linhagem de postura e atua na sinalização *TGF- β* de fatores de crescimento (WINSTON et al., 1999; AOYAMA et al., 2004). A sinalização de fatores de crescimento é necessária para promover o correto desenvolvimento da musculatura esquelética em vertebrados e as aves de postura, apesar de menores, apresentam o padrão normal de desenvolvimento.

Os sinalizadores intracelulares encontrados foram a fosfatase de proteína 3 (PPP3R1), PTPL-1 RhoGAP1 (LOC424488) e Ras GTPase (LOC430923), todos envolvidos com a via de sinalização das kinases MAP e também com as vias de sinalização promotoras da aderência entre células (MAMMUCARI et al., 2005; SANNA et al., 2005). A presença de membros da via de adesão celular entre os sinalizadores intracelulares pode estar indicando diferenciação muscular. Outros indicadores deste estágio do desenvolvimento muscular foram identificados como preferencialmente expresso nesta linhagem de postura. BOP1 (BOP), por

exemplo, foi identificado na musculatura cardíaca como sendo ativado por MEF2C (*Myocyte enhancer factor 2*), do programa de diferenciação muscular (ARNOLD; BRAUN, 2000; PHAN et al., 2005). *Radical fringe* (Rfng) também foi significativamente mais expresso na ave de postura e está associado a via de sinalização *Notch*, que é uma via reconhecida de manutenção do estado indiferenciado dos mioblastos (KITZMANN et al., 2006). Fatores de transcrição com homeodomínios também foram identificados neste grupo e são reconhecidos reguladores de organogênese. Entre eles, foram identificados o fator de transcrição homeodomínio 2 (LOC417728), especificamente expresso em músculo (MANUEL et al., 2000), e o fator de transcrição de homeodomínio *paired-like* (PTX1), envolvido com a organogênese e determinação da assimetria bilateral dos organismos (MARCIL et al., 2003), e também associado à regulação da atividade do hormônio prolactina (QUENTIEN et al., 2002) e ao receptor de liberação do hormônio da gonadotropina (JEONG; CHIN; KAISER, 2004). A identificação destes transcritos associados ao processo de diferenciação muscular parece sugerir que existe uma diferença no desenvolvimento da musculatura esquelética entre as linhagens de corte e postura. Entretanto, não foi possível inferir se a maior expressão de genes ligados à diferenciação muscular na linhagem de postura indicou que nesta linhagem o processo de diferenciação muscular ocorreu mais cedo, ou se na linhagem de corte a diferenciação ocorreu mais tarde. O atraso na diferenciação da musculatura esquelética na linhagem com maior desenvolvimento muscular foi anteriormente sugerido por Coutinho e colaboradores (1993).

Tabela 3 – Transcritos identificados com maior expressão na musculatura esquelética peitoral de frangos da linhagem selecionada para corte, juntamente com os nomes dos clones, para a localização dos transcritos nas bibliotecas de cDNA, e números LOC, para a localização dos transcritos no banco *Gene* do NCBI

(continua)

TRANSCRITOS MAIS EXPRESSOS NA LINHAGEM DE CORTE – TT		
Clone	Locos no genoma do frango	LOC
GGEZSM1004D08	Similar a Histona deacetilase 10	LOC417742
GGEZCB1022D11	-	NW_060207
GGEZCB1012H03	Similar ao complexo de transcrição CCR4-NOT	LOC417851
GGEZEB1037D04	Similar a Decorina	LOC417892
GGEZSM1004F10	Receptor de manose 6-fosfato	LOC396044
GGEZCB1029C05	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	GAPDH
GGEZSM1029G06	Similar a importina alfa Q2	LOC418870
GGEZEM1001A05	Similar a proteína ribossomal L15	LOC428442
GGEZLB1002F11	Similar a proteína 10 de ligação a receptores de fatores de crescimento	LOC420948
GGEZSM1031C01	Similar a proteína ribossomal L53	LOC420196
GGEZSM1009F03	Similar a Histona H3.3	LOC428560
GGEZCB1031B03	Similar a <i>forkhead box O3A</i>	LOC421769
GGEZEM1001D04	Fator 1 de elongação eucariótico alfa 1	EEF1A1
GGEZLB1022D06	Similar ao precursor de <i>Syndecan 1</i> (SYND1)	LOC421960
GGEZEB2011F04	Similar a quinase de proteína serina/treonina MASK	LOC422231
GGEZCB1012C08	Similar a proteína CHML	LOC422266
GGEZSM1015C05	Similar to <i>Platelet-endothelial tetraspan antigen 3</i>	LOC423105
GGEZCB1020E03	Proteína hipotética – domínio de Histona chaperona envolvida no silenciamento gênico (COG5137)	LOC423892
GGEZCB1016B11	Colágeno alfa 3 tipo IV	LOC396548
GGEZCB1009E11	Proteína hipotética com domínio <i>zinc finger 650</i>	LOC424158
GGEZSM1010F03	Similar a MCM6 (fator de replicação do DNA)	LOC424295
GGEZEB1018C08	Proteína hipotética com domínio <i>zinc finger 644</i>	LOC424510
GGEZSM1014C09	Similar a proteína Nrd1, <i>N-arginine dibasic convertase</i>	LOC424635
GGEZSM1026D06	Similar a <i>Septin</i>	LOC424843
GGEZEM1001E04	Similar a citocromo c redutase	LOC415752
GGEZSM1004B06	Similar a citocromo c oxidase, subunidade IV	LOC415826
GGEZLB1026H07	Similar a glutamina fructose 6-fosfato amidotransferase 2	LOC416372
GGEZLB1026B12	Protocaderina 2	PCDH2
GGEZLB1008G10	Similar a proteína ribossomal S14	LOC416275
GGEZEB1011E03	Similar a ATP sintase, H ⁺ transporte	LOC416495
GGEZSM1014C02	Similar a tuberina, <i>tuberous sclerosis 2</i>	LOC416552
GGEZCB1021F04	Similar a <i>heat shock protein beta 8</i> (HspB8)	LOC416988

Tabela 3 – Transcritos identificados com maior expressão na musculatura esquelética peitoral de frangos da linhagem selecionada para corte, juntamente com os nomes dos clones, para a localização dos transcritos nas bibliotecas de cDNA, e números LOC, para a localização dos transcritos no banco *Gene* do NCBI

(conclusão)

TRANSCRITOS MAIS EXPRESSOS NA LINHAGEM DE CORTE – TT		
Clone	Locos no genoma do frango	LOC
GGEZCB1003C09	Similar a proteína de ligação a guanina nucleotídeo, beta 2	LOC417044
GGEZSM1007A10	Similar a proteína ribossomal L7a	LOC417158
GGEZLB1012G05	-	NW_060634.1
GGEZCB1033E06	Similar a proteína PspH-A, kinase fosforilase gama 1	LOC417543
GGEZSM1007C04	Proteína hipotética com domínio <i>zinc finger</i> tipo CCCH	LOC419260
GGEZLB1029D08	TPX2, proteína associada a microtubule e a proliferação-100	LOC415270
GGEZEB1005H02	Similar ao fator 600 associado ao retinoblastoma	LOC419469
GGEZEB2012E07	Família CHMP, membro 7	LOC419535
GGEZSM1009F02	Similar a UDP-galactose 4-epimerase	LOC419686
GGEZLB1003G07	SM22, <i>Transgelin</i>	SM22
GGEZSM1013G08	Similar a proteína ribossomal S25	Gga.9181
GGEZEB2001E06	UNR, <i>cold shock domain containing E1, RNA-binding</i>	LOC419886
GGEZSM1016B11	Similar a proteína ativadora de MAPK	LOC420134
GGEZLB1003G05	Similar ao precursor de <i>valosin</i>	LOC427410
GGEZEB1018C10	Fosfatase de serina treonina 2A	PPP2R1A
GGEZEM1001C12	Proteína ribossomal S30	Gga.4644
GGEZCB1009E06	Similar a proteína hipotética	LOC429629
GGEZLB1029B05	Similar a subunidade 8 do proteasoma não-ATPase	-
GGEZCB1005E09	Kinase de proteína ativadora de AMP	Gga.8821
GGEZEB1017F10	-	NW_081512
GGEZCB1007F08	Similar a <i>ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5</i>	LOC426074
GGEZCB1020F07	Selenoproteína W	Gga.19061
GGEZLB1029H07	Similar a <i>U5 snRNP specific protein</i>	LOC430782
GGEZCB1027C05	Similar a acetil CoA acetiltransferase 2	LOC426847
GGEZSM1022F05	Beta 5 – Tubulina	LOC396254
GGEZSM1004G10	Proteína hipotética	Gga.5582
GGEZEB1018C07	Colágeno alfa 1 tipo IIA	COL2A1
GGEZLB1029G10		
GGEZCB1008B11		

Tabela 4 – Transcritos identificados com maior expressão na musculatura esquelética peitoral de frangos da linhagem selecionada para postura de ovos, juntamente com os nomes dos clones, para a localização dos transcritos nas bibliotecas de cDNA, e números LOC, para a localização dos transcritos no banco *Gene* do NCBI

TRANSCRITOS MAIS EXPRESSOS NA LINHAGEM DE POSTURA - CC		
Clone	Locos no genoma do frango	LOC
GGEZCB1004A09	Similar ao fator de transcrição com homeodomínio 2	LOC417728
GGEZEB1037E04	Precursor de <i>Amyloid beta (A4)</i>	APP
GGEZEB2006F06	Similar a pré-proteína colágeno alfa 2 tipo IV	LOC418752
GGEZCB1032E09	-	Gga.13168
GGEZCB1015B01	Similar a <i>NEDD 8 ultimate buster 1</i> (NY-REN-18 antigen)	LOC420433
GGEZEB2015G09	Fosfatase de proteína 3	PPP3R1
GGEZEB1014B10	<i>F-box only protein 25</i>	LOC421906
GGEZSM1006D08	Similar a proteína hipotética com domínio <i>Kelch-like</i>	LOC422226
GGEZLB1008F11	<i>High mobility group protein 2</i>	HGM2
GGEZSM1011D05	Similar ao domínio <i>jumonjii</i>	LOC422917
GGEZEB1018G04	BOP1	BOP
GGEZSM1005D11	Similar ao fator de resposta ao butirato	LOC428877
GGEZLB1006D04	Similar a <i>ankyrin 3</i>	CHANK3
GGEZLB1006C03	Similar a proteína hipotética com domínio <i>Barmotin</i>	LOC423804
GGEZSM1007C08	Similar a <i>PTPL-1 associated RhoGAP1</i>	LOC424488
GGEZLB1012H05	Similar ao precursor de CGI-100	LOC424499
GGEZEB2013A04	Similar a proteína hipotética com domínio <i>Barmotin</i>	LOC424684
GGEZEB1020C07	<i>Mitotic-kinesin like protein 1</i>	LOC415567
GGEZLB1005F05	Fator de transcrição com homeodomínio <i>Paired-like</i>	PTX1
GGEZEB1016D03	Fator de transcrição geral IIIH	Gga.2867
GGEZCB1009H11	Miosina XVIIIb	LOC416905
GGEZEB1013G10	Similar a proteína de transferência de fosfatidilinositol	LOC416912
GGEZEB2003E03	Similar a proteína de parada no crescimento (associada a formação de neurônios)	LOC417305
GGEZEB1016C07	<i>Radical fringe</i>	Rfng
GGEZSM1031C03	Similar a <i>Williams Beuren syndrome chromosome region 21</i>	LOC417473
GGEZCB1028G10	-	Gga.16326
GGEZCB1003C03	Similar ao fator de inibição de tradução eucariótico 2C	LOC419629
GGEZSM1004G05	<i>Neuron navigator 1</i>	LOC421163
GGEZSM1027G05	-	NW_060761
GGEZEB2004E09	Similar a proteína hipotética	LOC427289
GGEZEB1022E09	<i>Ankyrin 1</i>	CHANK1
GGEZSM1020E08	Histona acetiltransferase	Gga.5782
GGEZCB1016F10	Similar a <i>Ras GTPase activating like protein</i>	LOC430923
GGEZLB1009D02	Similar a Caspase 9	LOC426970
GGEZLB1026E10	-	NW_096767.1
GGEZEB2005A05	Similar a <i>dedicator of cytokinesis protein 1</i>	LOC426270
GGEZCB1006H01	Similar a ORF2	LOC425930

4.4.1 Validação dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frango por RT-PCR quantitativo

Transcritos diferencialmente expressos entre as linhagens de corte e postura indicados por microarranjos foram selecionados para serem validados pela técnica de RT-PCR quantitativo (RT-PCRq). *Syndecan 1*, *Tuberous sclerosis 2*, fator 600 de associação ao retinoblastoma e fosfatase de serina treonina 2A foram aleatoriamente selecionados para serem validados entre os transcritos quantificados como mais expressos na musculatura esquelética da linhagem de corte em relação à de postura. *F-box 25* e BOP1 também foram selecionados para esta validação, por serem mais expressos na musculatura esquelética das poedeiras. Iniciadores específicos foram obtidos para os sete transcritos selecionados e para β -actina (usada como controle constitutivo) para a quantificação por amplificação de amostras de cDNA de musculatura esquelética peitoral de dez animais de cada linhagem, todos no estágio HH35 do desenvolvimento embrionário.

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001) foi utilizado para a quantificação relativa da expressão gênica, tendo a β -actina como controle. Todos os cálculos de $\Delta\Delta Ct$ foram realizados tendo a média de Ct determinada na linhagem de corte como referência (tratamento 1, na fórmula de cálculo do $\Delta\Delta Ct$, do item 3.1.9 de material e métodos), de forma que valores negativos indicaram maior expressão na musculatura da linhagem de postura (Tabela 5). Os resultados revelaram que *Syndecan 1*, *Tuberous sclerosis 2* e a fosfatase de serina treonina 2A foram mais expressos na musculatura das aves de corte em relação as de postura, confirmando assim, os resultados dos microarranjos. A proteína F-box 25 e BOP1 também confirmaram os dados de expressão obtidos nos microarranjos, indicando que estes transcritos são realmente mais expressos na musculatura das aves de postura em relação as de corte. Dos seis transcritos selecionados para esta validação, apenas o fator 600 Rb-associado não confirmou os resultados sugeridos pelo microarranjo, tendo sido quantificado por RT-PCRq como mais expresso na musculatura da linhagem de postura em relação a de corte (Tabela 5). O fator 600 foi associado à saída irreversível do ciclo celular e com a manutenção do estado pós-mitótico dos mioblastos, para o início da diferenciação muscular (SCHNEIDER *et al.*, 1994; CAMARDA *et al.*, 2004). Este novo resultado de quantificação para o fator 600 é, portanto, ainda mais coerente com sua

função biológica e com os resultados do perfil de expressão de transcritos associados à diferenciação muscular detectado nas aves de postura por este trabalho.

Tabela 5 - Médias e desvios padrão da expressão dos transcritos diferencialmente expressos descritas em unidades Ct e o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação das diferenças em expressão entre as linhagens

Transcrito	n	Ct na musculatura das aves de corte	Ct na musculatura das aves de postura	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
β -actina	10	16,31 \pm 0,65	16,10 \pm 0,98	-	-
<i>Syndecan 1</i>	10	21,20 \pm 0,72	21,52 \pm 0,74	0,53	0,69
<i>Tuberous sclerosis 2</i>	10	19,01 \pm 1,28	19,55 \pm 0,60	0,76	0,59
S T fosfatase 2A	10	32,23 \pm 0,47	32,62 \pm 0,34	0,60	0,66
Fator 600 Rb-associado	10	28,85 \pm 0,32	26,16 \pm 0,85	-2,48	5,57
Proteína F-box 15	10	27,79 \pm 0,87	26,89 \pm 0,76	-0,69	1,62
BOP 1	10	28,78 \pm 1,02	28,07 \pm 1,09	-1,16	2,23

4.4.2 Validação *in silico* dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frango com potenciais diferentes de crescimento

A genética quantitativa tem trabalhado para assegurar os ganhos genéticos para características de produção em aves. Hoje, os mapas de ligação para o genoma do frango já incluem 2.172 *loci* genéticos (HILLIER et al., 2004) e inúmeros QTLs mapeados ao longo do genoma para as principais características de produção (revisado por HOCKING, 2005). No entanto, para revelar o potencial de emprego dos QTLs na seleção assistida por marcadores seria necessário identificar os genes presentes na região cromossômica mapeada como QTL e determinar os efeitos das mutações sobre os fenótipos de interesse (LEDUR et al., 2003).

As diferenças fenotípicas observadas entre indivíduos são resultado de mutações e de expressão gênica diferencial. Transcritos diferencialmente expressos foram identificados entre linhagens de aves selecionadas para corte e postura por estratégias de genômica funcional. O passo seguinte seria eleger diretamente estes como transcritos candidatos, dando início às buscas pelas mutações e às avaliações de seus efeitos sobre características ou fenótipos de interesse.

Estas avaliações funcionais estão inevitavelmente associadas às análises *in vivo*, por métodos que permitam a super-expressão do gene, assim como o *knockout* ou *knockdown* no organismo e a geração de transgênicos. Estes métodos são comumente utilizados em plantas, onde a introdução de genes nos tecidos e a transgenia já foram estabelecidos (CHRISTOU et al., 2006; UMEZAWA et al., 2006). Mas esta mesma eficiência não pode ser observada quando as análises são conduzidas em animais domésticos, principalmente porque existem limitações éticas e técnicas. *Gallus gallus* levam algumas vantagens em relação aos outros animais domésticos porque os embriões são fáceis de serem manipulados, é uma espécie modelo, com a seqüência do genoma disponibilizada, mapas genéticos densos, com inúmeros QTLs mapeados em populações segregantes e com microarranjos construídos para a análise do padrão de expressão tecido-específico. Entretanto, os frangos transgênicos são em sua maioria inviáveis, porque poucos sobrevivem e continuam o desenvolvimento no ovo após a manipulação (BROWN et al., 2003).

Os passos seguintes à seleção de candidatos são, portanto, complexos, de forma que as estratégias de seleção ou indicação destes transcritos devem ser aprimoradas. Os transcritos sugeridos pelos ensaios de microarranjos deste trabalho foram validados por RT-PCRq e o somatório dos resultados destas duas estratégias vem sendo considerado aceitável para a indicação de transcritos candidatos por outros trabalhos (ZHANG et al., 2004; MOTT; IVARIE, 2004; DELGADO et al., 2003, entre outros). Este trabalho procurou ainda confirmar estes resultados de expressão diferencial a partir da integração destas informações obtidas por estratégias de genômica e genômica funcional com aquelas que vêm sendo geradas a partir do mapeamento de QTLs pela genética quantitativa. Para isso, os transcritos identificados como diferencialmente expressos por microarranjos foram localizados nos cromossomos do genoma do frango e, subseqüentemente, foram verificados os QTL mapeados naquelas regiões. O transcrito diferencialmente expresso entre linhagens de frango, também localizado dentro de uma região contendo um QTL, poderia ser ou estar entre os influenciadores da característica de produção associada ao QTL.

A seqüência do genoma do frango disponibilizada no NCBI foi utilizada para localizar os locos dos transcritos alvo. Estes locos transcritos foram organizados no genoma em números LOC ou Gga, que permitiram o acesso às informações estruturais e funcionais correspondentes nos bancos *Gene* e *Unigene* do NCBI, e também localizá-los precisamente nos cromossomos, pela ferramenta do *Map Viewer*. Embora o QTL não seja precisamente localizado

no cromossomo, existe uma região limite a qual ele pertence, que é delimitada por marcadores moleculares, conhecidos como marcadores flanqueadores. Estes marcadores puderam ser localizados no mapa genético determinado por Martien Groenen da Universidade de Wageningen na Holanda (WURC), que também pôde ser associado ao mapa de locos no *Map Viewer*. O posicionamento dos marcadores e dos LOCs dos transcritos candidatos permitiu determinar aqueles localizados dentro de regiões definidas QTLs.

Os QTLs mapeados para o genoma do frango foram em sua maioria localizados entre os cromossomos 1 a 9, os macro-cromossomos (HOCKING, 2005). Por isso, apenas estes foram considerados nesta validação considerada *in silico*. Dos 61 transcritos altamente expressos na musculatura esquelética da linhagem de corte, 24 foram posicionados nos macro-cromossomos e destes, 19 foram localizados em regiões contendo QTLs (Tabela 6). Entre os sete posicionados no cromossomo 1, por exemplo, seis foram localizados em QTLs, incluindo o receptor de manose 6-fosfato, GAPDH e a proteína *importin Q2*, que foram localizados em QTLs mapeados na população experimental da Embrapa, a mesma utilizada neste trabalho, para características de peso de peito e comprimento do intestino (NONES et al., 2005). A proteína 10 adaptadora de receptor de fatores de crescimento, que foi descrita como influenciadora do processo de proliferação celular via os receptores de insulina e IGF I, foi localizada em uma região do cromossomo 2 anteriormente mapeada como influenciadora de rendimento de peito e carcaça e conversão alimentar, também na população da Embrapa (BARON, 2004). As histonas 3.3 e a envolvida com o silenciamento gênico foram localizadas nos cromossomos 3 e 6, respectivamente, ambas em QTLs mapeados em outras populações, para peso e rendimento de coxa (SIWEK et al., 2004; IKEOBI et al., 2004). As proteínas hipotéticas com domínio *zinc finger* 650 e 644 foram localizadas nos cromossomos 7 e 8 respectivamente, também em regiões contendo um QTL influenciador de rendimento de coxa e outro associado ao número de ovos (IKEOBI et al., 2004; TUISKULA-HAAVISTO et al., 2002). Apesar de influenciar uma característica para a seleção das aves de postura, este trabalho sugeriu um papel biológico para estas proteínas hipotéticas ainda não caracterizadas associado à produção. Finalmente, *Septin*, descrita com papel na proliferação celular, foi localizada no cromossomo 9 do genoma do frango e também posicionada em um QTL mapeado para a característica de peso da musculatura da perna em relação ao peso dos ossos (IKEOBI et al., 2004).

Entre os 37 transcritos identificados como altamente expressos na musculatura esquelética da linhagem de postura, 18 foram posicionados nos macro-cromossomos e 10 localizados em QTLs, a maioria deles associado ao peso das partes (moela, costas, gordura abdominal, pé e comprimento do intestino) (Tabela 7). *PTPL-1 associated RhoGAP1* (sinalização celular) e o precursor de CGI-100, uma proteína transmembrana de transporte do retículo endoplasmático (BREUZA et al., 2004), foram localizados em regiões próximas no cromossomo 8 do genoma do frango (14 e 14.3Mb), em uma região contendo um QTL para o número de ovos produzidos (TUISKULA-HAAVISTO et al., 2002).

O perfil dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as musculaturas esqueléticas de aves de corte e postura sugeriu alguns membros das vias de sinalização e do metabolismo energético celular como as vias preferenciais influenciadas pelos programas de melhoramento para crescimento, uma vez que foram os mais frequentes entre os altamente expressos na linhagem de corte. *Syndecan 1* e a proteína 10 de ligação a receptores de fatores de crescimento foram ainda confirmadas pela validação *in silico*, por estarem localizadas em regiões contendo QTLs para peso, uma das características associadas ao crescimento. Esta validação também sugeriu transcritos associados ao processo de divisão celular (*septin*), histonas e proteínas hipotéticas não-caracterizadas com domínios *zinc finger* (644 e 650) como candidatas a serem funcionalmente investigadas *in vivo* e avaliadas quanto ao potencial de gerar marcadores moleculares associados à característica de crescimento. Candidatos também foram sugeridos para a geração de marcadores moleculares segregantes em famílias selecionadas para o programa de melhoramento de poedeiras para aumentar a produção de ovos, especialmente PTPL-1 e o precursor da proteína transmembrana CGI-100, localizados em uma região do cromossomo 8 do genoma do frango contendo um QTL que influencia a característica de número de ovos produzidos. O número destes transcritos candidatos sugeridos e confirmados pela localização nos cromossomos poderá ainda ser aumentado conforme novos QTLs forem sendo mapeados nos macro e principalmente nos micro-cromossomos do genoma do frango, que têm sido foco atual da genética quantitativa desta espécie, inclusive do grupo da ESALQ-USP.

Tabela 6 – Validação *in silico* dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na **linhagem de corte (TT)** e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves

Locos no genoma do frango	LOC	Posição LOC (Mb)	Quantitative trait loci (QTL)			Referência
			Característica	Marcadores-limite	Posição (Mb)	
CROMOSSOMO 1 (GGA1)						
Similar a Histona deacetilase 10	LOC417742	17.4	-	-	-	-
-	NW_060207	29.9	Rendimento	MCW10 / ADL188	21 - 41.9	Ikeobi et al., 2004
Similar complexo de transcrição CCR4-NOT	LOC417851	32.7	Rendimento	MCW10 / ADL188	21 - 41.9	Ikeobi et al., 2004
Similar a <i>Decorin</i>	LOC417892	40.8	Rendimento	MCW10 / ADL188	21 - 41.9	Ikeobi et al., 2004
Receptor de manose 6-fosfato	LOC396044	68.2	Peso do peito	ADL319 / MCW58	59.6 - 71	Nones et al., 2005
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GAPDH	71	Peso do peito	ADL319 / MCW58	59.6 - 71	Nones et al., 2005
Similar a <i>importin alpha Q2</i>	LOC418870	161.4	Comp. intestino	MCW20 / ROS25	154 - 176	Nones et al., 2005
			Peso corporal	ADL183 / ROS025	147.5 – 177.5	Sewalem et al, 2002
CROMOSSOMO 2 (GGA2)						
Similar a proteína ribossomal L15	LOC428442	36.3	Peso do ovo	MCW247/ADL217	23 - 38.5	Tuiskula-Haavisto et al., 2002
Similar proteína adaptadora 10 a receptores de fatores de crescimento	LOC420948	80.8	Peito/CA/carcaça	MCW291/LEI147	73.3 - 90.5	Baron, 2004
Similar a proteína ribossomal L53	LOC420196	120.7	-	-	-	-
CROMOSSOMO 3 (GGA3)						
Similar a Histona H3.3	LOC428560	13.49	Peso corporal	MCW261/MCW83	0.03 - 15.9	Siwek et al., 2004
Similar a <i>forkhead box O3A</i>	LOC421769	65.7	Peso corporal	ADL371/ MCW126	46 - 74	Kerje et al., 2003
Fator 1 de alongação da tradução eucariótico	EEF1A1	79.84	Musculatura peitoral:perna	ADL306/LEI265	79 – 88.3	Ikeobi et al., 2004
Similar ao precursor de <i>Syndecan 1</i> (SYND1)	LOC421960	99.78	-	-	-	-

Tabela 6 – Validação *in silico* dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na **linhagem de corte (TT)** e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves

Locos no genoma do frango	LOC	Posição LOC (Mb)	Quantitative trait loci (QTL)			Referência
			Característica	Marcadores-limite	Posição (M)	
CROMOSSOMO 4 (GGA4)						
Kinase de proteína serina treonina MASK	LOC422231	3.24	-	-	-	-
Similar a proteína CHML	LOC422266	8.4	-	-	-	-
CROMOSSOMO 5 (GGA5)						
Similar a <i>Platelet-endothelial tetraspan</i>	LOC423105	13.15	Rendimento das coxas	LEI82 / MCW90	8.7 - 15.6	Ikeobi et al., 2004
CROMOSSOMO 6 (GGA6)						
Histona chaperona envolvida no silenciamento gênico	LOC423892	25.18	Rendimento das coxas/asas	ROS62 / ROS003	11 - 25.5	Ikeobi et al., 2004
CROMOSSOMO 7 (GGA7)						
Colágeno Alfa-3 tipo IV	LOC396548	4.77	Rendimento das coxas/asas e gordura corporal	LEI64 / ROS019	0.05 - 22.9	Ikeobi et al., 2004
Proteína <i>zinc finger 650</i>	LOC424158	19.3	Rendimento das coxas/asas e gordura corporal	LEI64 / ROS019	0.05 - 22.9	Ikeobi et al., 2004
Similar ao fator de replicação de DNA MCM6	LOC424295	31.35	Resistência a doenças	ADL180 / ADL315	24.7 – 31.7	Yonash et al., 1999

Tabela 6 – Validação *in silico* dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na **linhagem de corte (TT)** e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves

Locos no genoma do frango	LOC	Posição LOC (Mb)	Quantitative trait loci (QTL)			(conclusão)
			Característica	Marcadores-limite	Posição (Mb)	Referência
CROMOSSOMO 8 (GGA8)						
Proteína <i>zinc finger 644</i>	LOC424510	15	Número de ovos	MCW010 / ADL345	14.5 - 17.6	Tuiskula-Haavisto et al., 2002
Similar a proteína <i>Nrd1</i>	LOC424635	24.4	Peso corporal	ADL179 / ROS075	8.1 - 28.5	Sewalem et al., 2002
CROMOSSOMO 9 (GGA9)						
Similar a <i>Septin</i>	LOC424843	8.62	Musculatura da perna: OSSOS	ROS078 / MCW135	0.5 - 10.3	Ikeobi et al., 2004

Tabela 7 - Validação *in silico* dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na **linhagem de postura (CC)** e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves

Locos no genoma do frango	LOC	Posição LOC (Mb)	Quantitative trait loci (QTL)			Referência
			Característica	Marcadores-limite	Posição (Mb)	
CROMOSSOMO 1 (GGA1)						
Fator de transcrição com homeodomínio 2	LOC417728	11.2	-	-	-	-
Proteína precursora de Amyloid beta (A4)	APP	96.4	Gordura abdominal	LEI174/ADL361	60.5 - 112	Jennen et al., 2004
Similar a pré-proteína colágeno alfa 2 tipo IV	LOC418752	132	-	-	-	-
Similar a ORF2	LOC425930	150.6	Peso de pé / comp. do intestino	LEI079 / MCW145	147 – 152.4	Nones et al., 2005
CROMOSSOMO 2 (GGA2)						
-	Gga.13168	1.56	-	-	-	-
Similar a <i>NEDD 8 ultimate buster 1</i>	LOC420433	5.65	-	-	-	-
CROMOSSOMO 3 (GGA3)						
Fosfatase de Proteína 3	PPP3R1	5.94	Peso corporal	MCW261 / MCW083	0.03 – 15.97	Siwek et al., 2004
<i>F-box only protein 25</i>	LOC421906	89.9	Musculatura peitoral;perna	ADL306 / LEI265	79 – 88.3M	Ikeobi et al., 2004
CROMOSSOMO 4 (GGA4)						
Proteína hipotética com domínio Kelch-like	LOC422226	3	-	-	-	-
<i>High mobility group protein 2</i>	HGM2	43.9	-	-	-	-

Tabela 7 – Validação *in silico* dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens de frangos. Localização nos cromossomos do genoma do frango dos transcritos identificados como mais expressos na **linhagem de postura (CC)** e posicionados na região de QTLs mapeados para características de produção em aves

Locos no genoma do frango	LOC	Posição LOC (Mb)	Quantitative trait loci (QTL)			Referência
			Característica	Marcadores-limite	Posição (Mb)	
CROMOSSOMO 4 (GGA4)						
Similar a <i>jumonjii domain containing 1A</i>	LOC422917	85.6	Peso vivo/moela/costas/% gordura/%peito	LEI085 / MCW174	83 - 85	Baron, 2004
BOP-1	BOP	86	-	-	-	-
CROMOSSOMO 5 (GGA5)						
Similar ao fator de resposta ao butirato	LOC428877	25.2	Cor	MCW090 / LEI145	15.8 – 27.6	Ruy, 2004
			Peso magro:ossos	ADL292 / ROS084	22.7 – 24.2	Ikeobi et al., 2004
CROMOSSOMO 6 (GGA6)						
Similar a <i>ankyrin 3</i>	CHANK3	8.4	-	-	-	-
Similar a proteína hipotética	LOC423804	19.4	Resistência à doenças	ADL138 / LEI097	10.5 – 19.6	Zhou; Li; Lamont, 2003
CROMOSSOMO 8 (GGA8)						
Similar a <i>PTPL-1 associated RhoGAP1</i>	LOC424488	14	Número de ovos	MCW100 / ADL345	14 – 17.6	Tuiskula-Haavisto et al., 2002
			Peso corporal	ADL179 / ROS075	8.1 – 28.5	Sewalem et al., 2002
Similar ao precursor de CGI-100, proteína transmembrana de transporte	LOC424499	14.3	Número de ovos	MCW100 / ADL345	14 – 17.6	Tuiskula-Haavisto et al., 2002
			Peso corporal	ADL179 / ROS075	8.1 – 28.5	Sewalem et al., 2002
Similar a proteína hipotética	LOC424684	27.7	Peso corporal	ADL179 / ROS075	8.1 – 28.5	Sewalem et al., 2002

4.5 Análise do padrão de expressão dos 4.534 transcritos identificados por seqüenciamento de ESTs entre cinco tecidos de *Gallus gallus*

Embora a análise da seqüência primária seja suficiente para indicar a função molecular de um gene, ela não sugere o papel celular ou fisiológico das proteínas correspondentes (SU et al., 2002). A função biológica de transcritos desconhecidos tem sido tradicionalmente investigada pelo nível de expressão tecido-específico. Por exemplo, os transcritos especificamente expressos nos olhos, muito provavelmente estão associados à visão. Por isso, ensaios de *Northern blot* para múltiplos tecidos são freqüentemente realizados para conhecer a função de transcritos novos. Os microarranjos vêm permitindo a construção de ensaios equivalentes de *Northern blot* para múltiplos tecidos, mas para inúmeros transcritos simultaneamente (SU et al., 2002; EISEN et al., 1998; Zhang et al., 2004).

A quantidade de informações biológicas disponíveis para a maioria dos transcritos transferidos para os microarranjos deste estudo, ainda é limitada. A fim de avançar na caracterização destes transcritos, sondas de cDNA de cinco tecidos foram sintetizadas para hibridizar os microarranjos, para que os perfis de expressão obtidos orientassem a seleção dos transcritos candidatos para serem funcionalmente investigados em ensaios futuros. A abundância desses transcritos foi determinada no “cérebro”, “fígado”, “coração”, “pele” e “musculatura esquelética”. Os tecidos foram coletados de aves com 21 dias pós-eclosão, todos da linhagem de corte da Embrapa Suínos e Aves. Para a obtenção dos 30 µg de RNA total necessários para as sínteses das sondas, amostras de três animais foram misturadas. Assim, as possíveis variações individuais ou referentes à dissecação dos tecidos foram minimizadas com os *pools*. Um total de oito membranas foi necessário para realizar todos os ensaios de hibridização com as cinco sondas dos tecidos em triplicata, sendo que cada uma foi reutilizada no máximo quatro vezes.

Os valores de intensidade de sinal obtidos com as hibridizações das sondas foram avaliados de duas formas. A primeira, com base no modelo estatístico misto (WOLFINGER et al., 2001), para identificar os transcritos diferencialmente expressos, aqueles com padrão de expressão tecido-específico e os preferencialmente expressos. Estes grupos de transcritos permitiram indicar os candidatos tecido-preferenciais, sugeridos com base nos níveis de expressão nos tecidos de interesse; e também conferir confiabilidade ao padrão de expressão que foi obtido com as hibridizações, uma vez que transcritos de função conhecida foram identificados

como preferencialmente expressos nos tecidos esperados. Os “músculo-esqueléticos-preferenciais” foram os candidatos alvos deste estudo, mas o banco total de dados de expressão também poderá ser utilizado para a seleção de candidatos nos outros tecidos avaliados. A segunda forma de análise considerou o padrão de expressão de todos os RNAm do microarranjo para prever as funções daqueles ainda não-caracterizados, com base nos métodos de agrupamento sofisticados, que permitiram agrupar transcritos conhecidos e desconhecidos como co-expressos.

4.5.1 Transcritos diferencialmente expressos entre os tecidos amostrados

O modelo estatístico misto aplicado aos dados de expressão revelou os transcritos diferencialmente expressos entre “musculatura esquelética”, “coração”, “pele”, “fígado” e “cérebro”, em comparações realizadas dois a dois (Tabela 8). A comparação entre “coração” e “musculatura esquelética”, por exemplo, revelou 393 transcritos diferencialmente expressos entre as musculaturas amostradas ($P < 0,05$) (Tabela 8). Entre eles, foram identificadas as proteínas sarcoméricas/estruturais, como as miosinas de cadeia pesada, actinina 2, tropomodulina, tropomiosinas, troponias (I e T), tubulina e inibidores de polimerização de actina. Algumas destas proteínas estruturais foram coerentemente detectadas no microarranjo, de acordo com as isoformas características de musculatura cardíaca e esquelética. Tropomodulinas, tropomiosinas e miosinas de cadeia pesada, por exemplo, proteínas características de musculatura esquelética, foram detectadas como altamente expressas nesta musculatura em relação à cardíaca. Dessa forma, a própria estrutura ou função biológica destas proteínas permitiu confirmar os dados de expressão obtidos pelos microarranjos. Além das proteínas musculares, foram ainda identificadas como diferencialmente expressas as proteínas associadas ao metabolismo energético e ao transporte do íon Ca^{2+} na célula. Portanto, as hibridizações com as sondas de “coração” e “musculatura esquelética” permitiram alcançar um perfil de expressão característico do tecido muscular, indicando que estes dados de expressão poderão ser utilizados para a seleção de transcritos candidatos para serem caracterizados por estudos funcionais no sistema muscular. Foram identificados 137 transcritos não-caracterizados apenas neste grupo de diferencialmente expressos. O banco de dados de expressão dos 4.534 transcritos em cinco tecidos será, portanto, uma importante fonte de categorização de transcritos de frango.

Tabela 8 - Número de genes diferencialmente expressos entre “coração”, “fígado”, “cérebro”, “pele” e “musculatura esquelética” (P <0,05)

Comparações	Número de genes diferencialmente expressos
CB X CR*	277
CB X FG*	196
CB X ME*	483
CB X PL*	222
CR X FG*	226
CR X ME*	393
CR X PL*	212
FG X ME*	273
FG X PL*	84
ME X PL*	185

* ME – Musculatura esquelética, CR – coração, CB – cérebro, PL – pele e FG – fígado.

4.5.2 Transcritos preferencialmente expressos

Foram denominados transcritos preferencialmente expressos aqueles que apresentaram sinal de hibridização nos cinco tecidos, mas identificados pelo suporte estatístico (P<0,05) como mais expressos em apenas um deles em relação aos outros quatro. Este trabalho identificou 32 destes transcritos (Tabela 9). A função biológica predita permitiu confirmar alguns dos perfis de expressão característicos de cada tecido, especialmente com os transcritos preferencialmente expressos no “coração”, onde foram identificadas sete proteínas musculares, algumas delas isoformas cardíacas características, além de dois transcritos que codificaram para a proteína PDZ-LIM *cypher 1*, componentes do disco Z muscular e associadas à uma cardiomiopatia caracterizada pela dilatação ventricular (ARIMURA et al., 2004). O padrão de expressão na pele também sugeriu ser característico, uma vez que três das cinco proteínas pele-preferencialmente expressas foram componentes de matriz extracelular (Tabela 9). Estes resultados sugeriram a coerência entre o perfil de expressão detectado e as funções biológicas dos transcritos selecionados, conferindo a confiabilidade necessária para investigar a função biológica dos transcritos a partir destes níveis de expressão detectados nos diferentes tecidos amostrados.

Tabela 9 - Transcritos tecido-preferencialmente expressos identificados por microarranjos

Tecido	Clone	LOC	BlastN contra o genoma do frango
ME*	GGEZCB1004H10	LOC395761	Troponina T tipo 3 (musc. esquelético rápido)
	GGEZEB1005B12	LOC428677	Similar a cisplatina
CR*	GGEZCB1010F03	SOD2	Superoxido dismutase 2, mitochondrial
	GGEZEB1001F02	LOC396263	Actinina, alfa 2
	GGEZEB1005C03	LOC396227	Inibidor de polimerização de actina
	GGEZEB1011E02	LOC424127	Similar a N2B-Titin isoforma
	GGEZEB1013B02	LOC420182	Similar a proteína ribossomal L7
	GGEZEB1014D11	NNF1	Fator 1 de modulação de poliamina
	GGEZEB1019F08	LOC428353	Similar a tropomiosina cardíaca
	GGEZEB1030B05	LOC420001	Similar a proteína ribossomal L23
	GGEZEB1034D05	LOC422546	Smilar a ADP/ATP translocase
	GGEZEB2011F09	LOC417504	Similar a colágeno, tipo XXVI, alfa 1
	GGEZEB2012C09	LOC423610	Similar a proteína PDZ-LIM <i>cypher1</i>
	GGEZEB2013G05	LOC416652	Similar a alfa-A globina
	GGEZEB2014G08	LOC396013	Proteína C de ligação à miosina
	GGEZEB2015D05	LOC396433	Troponina T cardíaca, forma I
	GGEZEB2017E07	LOC423298	Similar a actina, alfa, cardíaca
	GGEZLB1004F02	LOC423610	Similar a proteína PDZ-LIM <i>cypher 1</i>
	GGEZSM1020E04	-	-
PL*	GGEZCB1021D11	LOC420564	Similar a colágeno alfa-2 tipo I
	GGEZEB1001F03	COL6A1	Colágeno alfa-1 tipo VI
	GGEZEB2003F06	OSF-2	Fator 2 osteoblasto-específico
	GGEZLB1003H02	CHBCAT	Beta catenina
GGEZSM1005D03	LOC418022	Similar a proteína de ligação a GTP; Proteína G-1	
CB*	GGEZCB1008C09	LOC424000	Similar a proteína 1 associada a Nck (NAP 1)
	GGEZEB1034F05	LOC416877	Similar a ataxina 2; <i>olivopontocerebellar ataxia 2</i>
	GGEZEB2004C04	CSFRP1	<i>Secreted frizzled related protein 1</i>
	GGEZEB2004G02	LOC418889	Similar a <i>lipoma HMGIC fusion partner</i>
	GGEZEB2011B04	LOC396014	Fator nuclear 2 (eritroide-derivado 2)
	GGEZLB1015D12	Gga.17399	
	GGEZSM1023C10	LOC424879	Similar ao domínio de tioredoxina 3
FG*	GGEZCB1019D06	LOC422446	Similar a proteína <i>short coiled-coil</i>

* ME – “Musculatura esquelética”, CR – “coração”, CB – “cérebro”, PL – “pele” e FG – “fígado”

4.5.3 Transcritos tecido-específicos

As hibridizações com as sondas de tecidos utilizadas neste trabalho sugeriram nove transcritos com perfil de expressão tecido-específico, ou seja, com sinal de hibridização detectado em um único tecido (Tabela 10). A função biológica predita foi utilizada para confirmar este padrão de expressão, mas outros métodos de quantificação precisariam ser empregados para descartar a hipótese de serem falso-positivos. Na verdade, os transcritos de pouca abundância e estes tecido-específicos muito provavelmente não estão representados nos microarranjos ou, caso estejam, devem estar diluídos abaixo do limite do potencial de detecção do microarranjo. Também existe a possibilidade de terem ocorrido perdas do material genético preso às membranas, após as sucessivas lavagens que permitiram a reutilização do arranjo. Ainda assim, os nove transcritos tecido-específicos foram investigados, porque foram detectados como abundantes em apenas um dos tecidos e estes resultados podem ser indicativos de suas respectivas funções biológicas. A ausência de sinal nos outros quatro tecidos pode estar representando um nível de expressão abaixo do detectável ou a perda do DNA pela reutilização.

Tabela 10 - Transcritos tecido-específicos identificados nos microarranjos, números LOC identificadores no NCBI e função biológica correspondente

Tecido	Clone	LOC	BlastN contra o genoma do frango
ME*	GGEZLB1020G11	LOC418353	Similar a <i>nNOS-DHHC zinc finger23</i>
	GGEZEB1017B08	LOC395214	Molécula orientadora de axônio, RGM-A
	GGEZSM1031G08		Similar a ORF 25 do cromossomo 2
CB*	GGEZLB1024D02	-	-
	GGEZLB1015B02	LOC415947	Similar a proteína 5 de ligação a RNA
	GGEZSM1006G04	LOC423861	Similar a proteína hipotética
CR*	GGEZEM1003A08	Gga.15014	-
PL*	GGEZSM1029H08	LOC422149	Receptor 23 acoplado a proteína G
FG*	GGEZLB1015B06	LOC419658	Similar ao domínio BSD

* ME – Musculatura esquelética, CR – coração, CB – cérebro, PL – pele e FG – fígado.

Foram identificados três transcritos com padrão músculo-esquelético-específicos. O transcrito *nNOS-DHHC zinc finger23* foi associado ao direcionamento da sintetase de óxido nítrico para os locais apropriados nos neurônios (nNOS), mediada por interações com os domínios PDZ-LIM (SAITOH et al., 2004). A molécula orientadora de axônio (RGM-A), também sugerida como músculo-esquelético-específica, foi identificada com funções na orientação da formação das projeções de neurônios em crescimento (MONNIER et al., 2004). O terceiro transcrito músculo-específico ainda não foi caracterizado. Embora sejam transcritos aparentemente representantes do tecido nervoso, estes níveis de expressão quantificados e os padrões de expressão obtidos por hibridização *in situ* vêm sugerindo possíveis papéis para *DHHC zinc finger* e RGM-A também no sistema muscular. Em *zebrafish*, o domínio DHHC *zinc finger* foi identificado em um fator de transcrição denominado *zisp*, com padrão de expressão similar a MyoD nos somitos de embriões em desenvolvimento (NAGAYA et al., 2002). Sendo MyoD um fator de transcrição determinante de fenótipo muscular, este padrão de expressão contribuiu para sugerir uma função biológica para este domínio nesse sistema. A família dos orientadores de axônio RGM é composta por três membros (RGM-A, RGM-B e RGM-C), todos também detectados nos somitos de camundongos (SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004). Portanto, estes transcritos foram identificados com padrão de expressão nas estruturas embrionárias responsáveis pela formação da musculatura esquelética dos organismos e também quantificados como altamente expressos na musculatura esquelética de aves com 21 dias de idade por este trabalho. Estes resultados sugeriram um papel biológico para estes transcritos durante o desenvolvimento muscular. A função fisiológica do sistema muscular é dependente dos sinais provenientes do sistema nervoso, não apenas para promover a contração muscular, mas também para determinar o tipo de fibra (de contração rápida ou lenta) a ser formada (ZHANG; McLEMAN, 1998; NIKOVITS et al., 2001; BUCKINGHAM et al., 2003). Outros papéis para a conexão entre os sistemas nervoso e muscular devem ainda ser investigados. Este trabalho selecionou o candidato músculo esquelético-específico RGM-A para ser funcionalmente investigado no sistema muscular em embriões de frango por ensaios de hibridização *in situ* e super-expressão. Os resultados obtidos serão apresentados a seguir nesta tese (item 4.6).

Também foram identificados três transcritos “cérebro-específicos”. Um deles foi a proteína 5 de ligação ao RNA, que é uma proteína associada à supressão tumoral, atuando como reguladora negativa do progresso do ciclo celular (RINTALA-MAKI; SUTHERLAND, 2004). A

outra foi uma proteína hipotética ainda não caracterizada, mas que apresentou em sua estrutura um domínio conhecido como MelB, presente nos transportadores do íon Na^+ e de carboidratos. A terceira proteína “cérebro-específica” também não foi caracterizada. A função biológica da proteína de ligação ao RNA e o domínio MelB parecem ser coerentes com a fisiologia do sistema nervoso, mas nenhuma especificidade havia sido descrita até o momento.

O transcrito identificado como “coração-específico” foi similar a um consenso do *Unigene* do NCBI (Gga.15014), ainda não caracterizado. O receptor 23 acoplado a proteína G (LOC422149) foi identificado como “pele-específico”. Estes receptores são da família de purinoreceptores P2Y, que foram identificados como expressos em diversos tipos celulares, atuando como receptores para os fatores 2, 4 e 7 de diferenciação do endotélio dos vasos sanguíneos (Edg-2, 4 e 7) (NOGUCHI; ISHII, SHIMIZU, 2003). Por fim, foi identificado como “fígado-específico” um transcrito hipotético, apresentando em sua estrutura um domínio BSD, de função desconhecida. Para estes três casos, a função biológica não contribuiu para determinar a coerência dos resultados dos microarranjos. Todos os nove transcritos identificados como tecido-específicos são candidatos sugeridos por este estudo para serem funcionalmente caracterizados em outros sistemas.

4.5.4 Validação da indicação dos transcritos diferencialmente expressos entre os tecidos de frango por RT-PCRq

Transcritos indicados como diferencialmente expressos entre “musculatura esquelética”, “coração”, “pele”, “fígado” e “cérebro” por microarranjos foram selecionados para serem validados por RT-PCRq. Foram selecionados a Laminina B1 (LOC417698), o Fator X-associado regulatório (LOC426623), a proteína 11 *ring finger* (LOC424631), MLLT6 (*myeloid/lymphoid* ou *mixed lineage-leukemia translocation to 6 homolog*) e CTL2 (LOC426094), por serem transcritos mais expressos na “musculatura esquelética” em relação aos outros tecidos. RGM-A também foi selecionado para ser validado, por apresentar um padrão de expressão “músculo esquelético-específico”. O método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$), proposto por Livak e Schmittgen (2001), foi utilizado para a validação destes dados, tendo a β -actina como controle. Todos os cálculos de $\Delta\Delta\text{Ct}$ foram realizados tendo a média de Ct determinada na “musculatura esquelética” como referência (tratamento 1, na fórmula de cálculo do $\Delta\Delta\text{Ct}$, do

item 3.1.9 de material e métodos), de forma que valores positivos indicaram maior expressão neste tecido em relação aos outros comparados. Os resultados indicaram que CTL2 não confirmou os dados de expressão obtidos nos microarranjos (Tabela 11). CTL2 havia sido identificado como mais expresso na “musculatura esquelética” em relação ao “cérebro” e ao “coração”, mas os dados negativos obtidos para $\Delta\Delta Ct$ indicaram exatamente o contrário. RGM-A foi quantificado como altamente expresso na “musculatura esquelética” em relação aos outros quatro tecidos. Não confirmou exatamente os dados dos microarranjos, mas foi identificado como mais expresso no tecido sugerido como específico. Representa provavelmente, um exemplo das perdas de DNA impresso após as sucessivas lavagens para a reutilização das membranas.

Tabela 11 - Médias e desvios padrão da expressão dos transcritos diferencialmente expressos descritas em unidades Ct e o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação das diferenças em expressão entre os tecidos amostrados

Transcrito	Ct					Resultado no Microarranjo	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	ME	CR	PL	FG	CB			
-actina	32,80±0,67	31,26±1,65	32,11±2,1	30,36±0,93	29,16±0,36	-	-	-
Laminina B1	35,09±0,67	33,95±0,05	39,00±1,8	40,23±0,65	32,38±0,53	ME>CB*	0,92	0,53
						ME>PL*	4,6	0,04
Fator regulador X	37,36±0,52	38,14±1,18	38,87±1,2	38,26±0,95	36,46±0,91	ME>CB*	2,70	0,15
						ME>PL*	2,2	0,21
						ME>FG*	3,31	0,10
Proteína <i>ring finger</i> 11	41,34±0,7	41,32±0,72	48,91±0,14	45,74±0,04	40,18±0,16	ME>FG*	6,83	0,008
						ME>CR*	1,52	0,34
MLLT6	39,49±0,7	39,3±0,91	47,23±0,75	41,3±1,57	36,47±1,78	ME>CR*	1,34	3,8e-06
						ME>PL*	8,43	0,002
						ME>CB*	0,61	0,65
CTL2	48,65±0,47	43,86±1,10	50,06±1,01	44,92±1,21	40,65±0,82	ME>CB*	-4,36	20,55
						ME>CR*	-3,24	9,48
RGM-A	30,69±0,42	32,04±1,07	36,97±0,20	37,29±0,66	31,71±0,31	ME>CR*	0,19	0,88
						ME>PL*	4,6	0,04
						ME>FG*	7,68	0,004
						ME>CB*	3,3	0,10

* ME – musculatura esquelética, CR – coração, PL – pele, FG – fígado, CB – cérebro

4.5.5 Análise de agrupamentos

As análises de microarranjos de organismos modelo estabeleceram que a regulação da transcrição coordenada de genes funcionalmente relacionados pode ser observada em pelo menos metade dos processos celulares (EISEN et al., 1998; NIEHRS; POLLET, 1999). Foi assim que os padrões de expressão começaram a ser utilizados para prever a função biológica de transcritos não-caracterizados, direcionando e sistematizando a caracterização experimental destes transcritos novos (NIEHRS; POLLET, 1999). Em leveduras, por exemplo, um grupo de mais de 200 genes envolvidos com o processamento primário de RNA e com a biogênese dos ribossomos foram identificados como transcricionalmente co-regulados (GASCH et al., 2000). Métodos de inferência estatística sugeriram que alguns desses genes não-caracterizados, localizados dentro destes grupos co-regulados, poderiam estar envolvidos com o processamento de RNA e biogênese de ribossomos (WU et al., 2002). Experimentos subsequentes de análise de mutantes de leveduras confirmaram muitos desses genes preditos (PENG et al., 2003).

Os valores de intensidade de sinal detectados para os transcritos do microarranjo deste estudo nos cinco tecidos (corrigidos para a quantidade de DNA impressa nos microarranjos e sinal de fundo - *background*), também foram utilizados para uma análise de agrupamentos. O objetivo foi agrupar os transcritos com base no grau de similaridade entre os padrões de expressão obtidos com os tecidos, para que os grupos organizados permitissem sugerir transcritos candidatos não-caracterizados para estudos funcionais *in vivo*. O método *K-means* (TAVAZOIE et al., 1999; QUACKENBUSH, 2001) foi utilizado com o auxílio do programa *Genespring* (SILICON GENETICS) e permitiu identificar cinco grupos de transcritos com este conjunto de dados de expressão (Figura 7). Estes cinco grupos indicaram padrões de expressão diferentes para cada um dos tecidos amostrados. De uma maneira geral, o agrupamento resultante indicou (pelas claves geradas entre tecidos) que os padrões de expressão obtidos no “fígado” e na “pele” foram mais similares entre si e ao padrão na “musculatura esquelética” do que “coração”, que foi mais similar ao padrão no “cérebro” (Figura 7). O agrupamento também permitiu indicar que, mesmo havendo algum grau de restrição de tecido (indicado pela presença dos blocos em vermelho no gráfico para cada um dos tecidos), a maioria dos transcritos de frango deste microarranjo não foi

expressa de uma maneira altamente tecido-específica, o que já havia sido sugerido pela análise estatística.

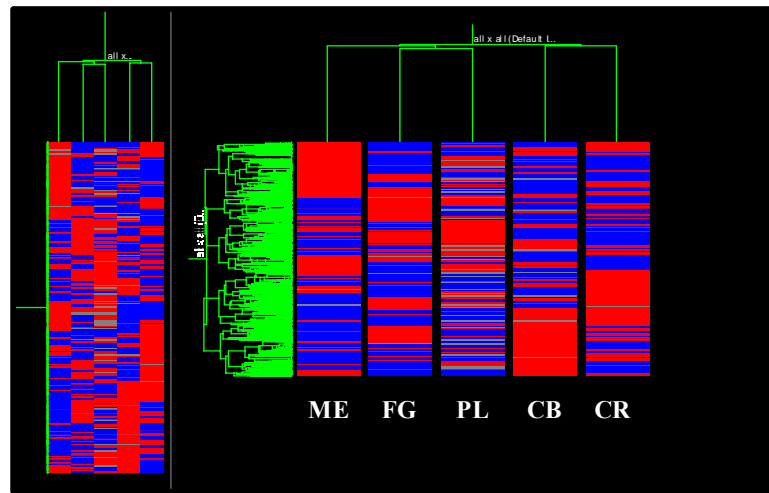


Figura 7 - Gráfico gerado pela análise de agrupamento realizada pelo programa *Genespring*. Os blocos em vermelho indicam conjuntos de transcritos altamente expressos no tecido correspondente; em azul, aqueles de baixa expressão. Claves na parte superior indicam os padrões de expressão mais similares entre os cinco tecidos, separando ME (musculatura esquelética), FG (fígado) e PL (pele) do padrão obtido em CB (cérebro) e CR (coração)

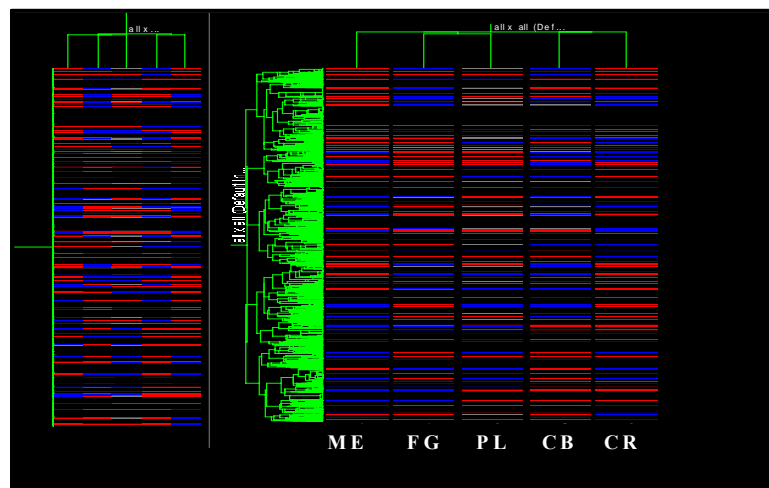


Figura 8 - Resultado obtido pelo programa *Genespring* após buscas por transcritos desconhecidos com padrão de expressão similar ao obtido para os transcritos mais expressos na “musculatura esquelética”

Organizar o banco de dados em grupos pelos padrões de expressão facilitou a identificação de transcritos candidatos. Este trabalho procurou pelos transcritos não-caracterizados que apresentaram padrão de expressão similar ao obtido para os transcritos mais expressos na “musculatura esquelética”. A princípio, 24 destes transcritos foram identificados como co-expressos àqueles de padrão muscular característico (Tabela 12, Figura 8). Podem ser, portanto, novos transcritos associados à formação ou manutenção do tecido muscular em aves. Domínios de proteínas conhecidas presentes nas seqüências destes 24 transcritos identificados como co-expressos ao grupo de mais expressos na musculatura esquelética, permitiram inferir os processos biológicos que a maioria deles estava associado (Tabela 12).

Tabela 12 - Transcritos desconhecidos identificados com padrão de expressão similar aos mais expressos na “musculatura esquelética”

(continua)

Clone	Domínio	LOC	Provável função biológica
GGEZCB1004H06	<i>Basigin 2</i>	Gga.4150	Indutor de metaloproteinase de matriz extracelular
GGEZCB1007G02	<i>Neuron navigator 2</i>	LOC422977	Domínio de calponina de ligação à actina
GGEZCB1014B03	RhoGTPase	LOC422171	Proliferação celular e sinalização JNK
GGEZCB1020C02	LRR	LOC428472	Interação proteína – proteína
GGEZCB1020D08	<i>Mahogunin</i>	LOC416660	Transdução de sinal e desenvolvimento
GGEZCB1033F04	<i>Kangai 1</i>	LOC423172	EGF <i>up-regulator</i> , modulador da adesão celular e migração
GGEZEB1002G07	-	-	-
GGEZEB1019D07	Kinase de piruvato 3	PKM	Metabolismo energético muscular
GGEZEB2001G11	Proteína ELG	LOC417552	Regulador de transcrição
GGEZEB2018F03	<i>GN exchange factor</i>	LOC415367	Transdução de sinal
GGEZEM1001C02	ORF 158	LOC417273	Transporte de carboidratos e metabolismo
GGEZLB1006D03	Citocromo P450	RGD708365	Degradação oxidativa

Tabela 12 - Transcritos desconhecidos identificados com padrão de expressão similar aos mais expressos na “musculatura esquelética”

(conclusão)			
Clone	Domínio	LOC	Provável função biológica
GGEZLB1018D04	-	Gga.22445	-
GGEZLB1023F05	<i>Dyskerin</i>	DKC1	Biogênese de ribossomos
GGEZLB1025B08	<i>Splicing factor</i>	Gga.4490	Proteína de ligação a RNA
GGEZLB1027C03	-		-
GGEZSM1002G04	<i>CutC cooper transport</i>	LOC423829	Homeostasis de cobre
GGEZSM1004B09	<i>Dodecyl CoA</i>	LOC416657	Metabolismo de ácidos graxos
GGEZSM1004D04	-		-
GGEZSM1005F04	Fus/TLS		Superfamília Ras e domínio de reconhecimento de RNA
GGEZSM1006G02	SLUG7	LOC416157	<i>Splicing factor</i>
GGEZSM1011C01	-	Gga.5994	-
GGEZSM1014H02	-	Gga.11044	-

Entre os domínios destes prováveis novos transcritos, foram identificados domínios de proteínas associadas ao processo de adesão e migração celular (domínio *Kangai 1*), seis domínios provavelmente associados com o processo de sinalização celular e um domínio de calponina de uma proteína orientadora de axônio (*neuron navigator 2*). O padrão de expressão obtido na musculatura esquelética sugeriu, portanto, um outro orientador de axônio como co-expresso aos transcritos mais expressos na musculatura, contribuindo para sugerir mais uma vez, um papel biológico para esta categoria de proteínas associadas ao desenvolvimento de neurônios com o sistema muscular. *Neuron navigator 2* seria um outro candidato, também sugerido por este estudo como foi RGM-A, para ser funcionalmente investigado no sistema muscular.

A estratégia de utilizar microarranjos para caracterizar os 4.534 transcritos de frango por ensaios em larga escala para múltiplos tecidos, cumpriu o papel principal de sugerir transcritos candidatos a partir de uma seleção tecido-preferencial baseada nos níveis de

expressão. Considerando apenas as análises realizadas sobre a “musculatura esquelética”, este trabalho sugeriu três transcritos com padrão de expressão músculo esquelético-específico, 137 transcritos não-caracterizados e diferencialmente expressos entre esta musculatura e a cardíaca e 24 também não-caracterizados com padrão de serem mais expressos na musculatura esquelética em relação aos outros quatro tecidos. Estes são todos os candidatos sugeridos por este trabalho para serem investigados *in vivo*, com potencial de levarem às descobertas de transcritos novos, importantes para o desenvolvimento ou manutenção do tecido muscular. Hibridizar os microarranjos com sondas de cDNA de tecidos permitiu ainda construir um banco de dados de expressão gênica, avaliado com suporte estatístico e de análises de agrupamento sofisticados, e obter os padrões de expressão característicos de cada um dos tecidos amostrados, o que também poderá ser utilizado para a caracterização de transcritos nos outros tecidos.

A molécula orientadora de axônio A (*Repulsive guidance molecule A*, RGM-A), sugerida como candidata por ter sido identificada como músculo esquelético-específica nestes ensaios de hibridização de microarranjos, foi selecionada para ser investigada *in vivo*. Além de permitir investigar a função biológica deste orientador de axônio no sistema muscular, as análises funcionais, que serão descritas a seguir, comprovaram que os microarranjos foram fontes confiáveis de seleção de transcritos candidatos entre os inúmeros identificados pelo seqüenciamento e ESTs.

4.6 Análise do padrão de expressão de RGM-A em embriões de frango

A molécula orientadora de axônio A (*Repulsive guidance molecule A*, RGM-A) foi um dos transcritos candidatos sugeridos pelas análises dos microarranjos como músculo esquelético-específico. Uma RT-PCRq realizada a partir de iniciadores específicos para a seqüência de RNA mensageiro depositada no NCBI (AY128507) permitiu confirmar a expressão preferencial de RGM-A na musculatura esquelética de frangos em relação aos outros quatro tecidos amostrados (Tabela 11). Em camundongos, a análise do padrão de expressão por hibridização *in situ* revelou sinais de transcritos de RGM-A nos somitos, as estruturas precursoras da musculatura esquelética dos organismos (SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004). Estas evidências contribuíram para sugerir um papel biológico para este orientador de axônio no sistema muscular esquelético. Niederkofler e colaboradores (2004) sugeriram uma associação dos

membros da família RGM com o processo de diferenciação muscular, mas isto ainda não foi apropriadamente investigado. Por isso, RGM-A foi selecionado para ser investigado *in vivo* em embriões de frango por este trabalho.

Com o objetivo de investigar uma possível função para RGM-A no sistema muscular, um trabalho colaborativo foi conduzido na forma de estágio sanduíche, supervisionado pela Profa. Dra. Susanne Dietrich, do departamento de Desenvolvimento Craniofacial do *King's College London* (Londres, Reino Unido). Em cinco meses de estágio, financiados pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 200262/2005-0), foram realizados ensaios de hibridização *in situ* (HIS), para determinar o padrão de expressão de RGM-A em embriões de *Gallus gallus*; e de super-expressão da ORF de RGM-A nos somitos, para investigar os efeitos sobre marcadores conhecidos.

O padrão de expressão de RGM-A em embriões de *Gallus gallus* foi determinado entre os estádios HH3 e HH25 do desenvolvimento (HAMBURGER; HAMILTON, 1951, Figura 9 e 10). RGM-A foi anteriormente descrito como especificamente expresso no sistema nervoso em formação (MATSUNAGA; CHÉDOTAL, 2004; SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004; NIEDERKOFLENER et al., 2004). De fato, as hibridizações *in situ* realizadas confirmaram o padrão nesse sistema (dados aqui não apresentados em detalhe).

RGM-A também foi detectado na região dos somitos, assim como havia sido observado em embriões de camundongos (SCHMIDTMER; ENGELKAMP, 2004). Os sinais de hibridização indicaram padrões distintos de expressão, sendo que nos somitos mais recentemente formados (sempre posicionados na região posterior do embrião), RGM-A foi detectado no somito todo, como pode ser observado nos embriões entre os estádios HH6 a HH10 (Figura 9). Este padrão sugeriu uma possível associação de RGM-A com a própria formação do somito, processo conhecido como somitogênese (POURQUIÉ, 2001). Esta associação já havia sido sugerida por Mawdsley e colaboradores (2004). Um padrão distinto foi observado nos somitos maduros, os primeiros a serem formados e posicionados na região mais anterior dos embriões. Nestes somitos, RGM-A foi mais fortemente expresso no domínio epaxial, formando um gradiente de expressão no sentido ventrolateral até o domínio hipaxial, como pode ser observado pelos cortes transversais dos embriões nos estádios HH8, HH9, HH10, HH16 (Figura 11) e na visão lateral e também nos cortes transversais dos embriões nos estádios HH20 e HH21 (Figura 12).

Por ser um orientador de axônio expresso nos somitos, as investigações funcionais concentram-se na hipótese de envolvimento de RGM-A com o modelo En1/Sim1, de determinação da separação morfológica das musculaturas epaxial e hipaxial dos vertebrados superiores, que ocorre de maneira dependente da inervação dos ramos do nervo espinal. Esta subdivisão epaxial-hipaxial da musculatura é uma das maiores inovações da miogênese dos vertebrados superiores, ocorrendo desde a superclasse dos *gnathostomatas* (peixes com mandíbulas), que permitiu o complexo movimento 3D da musculatura pela primeira vez na evolução (CHRIST; ORDAHL, 1995). Durante o desenvolvimento, o cordão espinal emite projeções de axônios para formar o nervo espinal, que ao nível torácico se divide em dois componentes principais, os ramos dorsal e ventral. São estes os ramos que inervam a musculatura esquelética do corpo. Este processo de inervação ocorre de maneira direcionada, uma vez que o ramo dorsal é orientado para inervar apenas o domínio epaxial do dermomiótomo; enquanto que o ramo ventral inerva apenas o domínio hipaxial. Dessa forma é possível distinguir a musculatura epaxial da hipaxial pela inervação. (TOSNEY, 1988; GOULDING et al., 2002; SHIRASAKI; PFAFF, 2002). Esta decisão de inervação diferencial dos domínios dos somitos é anterior à subdivisão molecular do dermomiótomo em domínios epaxial-hipaxial (TOSNEY, 1988; SHARMA et al., 2000). Estudos que envolveram a ablação micro-cirúrgica (TOSNEY, 1987) ou genética (KABLAR; RUDNICKI, 1999) do dermomiótomo epaxial revelaram um impedimento na formação do ramo dorsal do nervo espinal. Além disso, a ablação dos neurônios motores resultou em falhas nas projeções dos neurônios sensores em direção a seus alvos (LANDMESSER; HONING, 1986). Somado às observações morfológicas, estes resultados sugerem a existência de um mecanismo molecular comum entre a subdivisão dos domínios do dermomiótomo e a inervação diferencial dos ramos nervosos. A hipótese é que a musculatura esquelética em desenvolvimento esteja fornecendo as pistas de sobrevivência e orientação para os axônios.

Recentemente, o grupo da Dra Susanne Dietrich identificou alguns candidatos desta via molecular. En1 foi identificado como marcador específico de domínio epaxial e Sim1 de domínio hipaxial (CHENG et al., 2004; AHMED; CHENG; DIETRICH, 2006). A super-expressão de En1 no domínio hipaxial do dermomiótomo promoveu a regulação negativa de Pax3 e EphA4, marcadores deste domínio e uma alteração no padrão normal do desenvolvimento do ramo nervoso ventral em direção aos somitos (AHMED; CHENG; DIETRICH, 2006).

Entretanto, é pouco provável que En1 ou Sim1 atuem diretamente sobre os ramos nervosos em formação. Orientadores de axônios são candidatos a atuarem imediatamente *downstream* a En1 na via molecular. Mesmo não sendo específico de um dos domínios somitos, RGM-A foi investigado como a chave de conexão entre do modelo En1/Sim1 e os ramos nervosos em desenvolvimento.

Uma construção capaz de promover a expressão de RGM-A (pCA β -RGMA-IRES-EGFPm5) foi introduzida no domínio hipaxial dos somitos de embriões em estágio HH16, a fim de comprovar esta hipótese. Após um ou dois dias de re-incubação, a quantidade de RGM-A exógeno introduzida neste domínio dos somitos foi verificada pela coloração verde em microscópio de fluorescência, correspondente à expressão da proteína eGFP (primeira coluna de resultados da Figura 13). Embriões com quantidades suficientes de eGFP expresso foram utilizados para investigar os efeitos da super-expressão por HIS para quatro transcritos marcadores: **(1) EphA4**, um receptor de efrinas tipo kinase de tirosina, com função conhecida como orientadores da formação de axônios, expresso no domínio hipaxial dos somitos (GREFERATH et al., 2002; EGEA et al., 2005); **(2) Pax3**, também marcador de domínio hipaxial dos somitos, associado com a formação da musculatura esquelética (BRAND-SABERI, 2005; BROWN et al., 2005); **(3) Receptor 1b de BMP**, que foi selecionado uma vez que membros da família RGM foram identificados como co-receptores da via BMP (SAMAD et al., 2005; BABITT et al., 2005); e **(4) Myf5**, um dos fatores de transcrição determinantes de mioblastos (KABLAR et al., 2003). A comparação entre o lado controle, não transformado com a construção de expressão (resultados apresentados na terceira coluna da Figura 13) e o lado transformado dos embriões (resultados na coluna central da Figura 13), permitiu identificar fenótipos de regulação negativa da expressão de Pax3 e EphA4 após a introdução de RGM-A exógeno nos somitos. Nenhuma alteração na expressão dos marcadores BMP β 1 e Myf5 foi observada (Figura 13).

Fenótipos semelhantes foram obtidos a partir da super-expressão de En1 no mesmo domínio dos somitos (AHMED; CHENG; DIETRICH, 2006). No entanto, estes resultados ainda não foram conclusivos para confirmar a hipótese e inserir RGM-A no modelo En1/Sim1 de formação das musculaturas epaxial e hipaxial dos vertebrados. O padrão de expressão não obedeceu exatamente a subdivisão molecular dos somitos em domínios epaxial e hipaxial como era esperado e ainda precisariam ser testados os efeitos da super-expressão de

RGM-A sobre outros marcadores já testados no modelo (En1, Sim1, *Paraxis*, Pax7, Alx4 e Fgfr4) (AHMED; CHENG; DIETRICH, 2006) e sobre a inervação dos somitos, o que poderia ser feito utilizando-se a coloração RMO, específica para detectar axônios de neurônios em formação.

Não foi possível realizar todos estes experimentos durante o estágio de doutoramento realizado no *King's College London*. Por não ter sido conclusivo, os fenótipos obtidos permitiram ainda especular outras possíveis funções biológicas para RGM-A nos somitos. O fenótipo de efeito negativo sobre a expressão de Pax3 (Figura 13) pode estar sugerindo uma associação de RGM-A com a formação da musculatura esquelética por uma outra via molecular. Pax3 atua *upstream* a MyoD e Myf5 na determinação dos precursores hipaxiais, na manutenção do estado proliferativo dos mioblastos e regulação do processo de diferenciação muscular (BRAND-SABERI, 2005; BROWN et al., 2005). Em camundongos *plotch* (*Sp*) mutantes para Pax3 foi observada uma redução na musculatura dos membros e de músculos ventrais específicos (TREMBLAY et al., 1998). RGM-A exógeno interferiu com a expressão normal de Pax3 nas porções ventrolateral e central dos somitos, como pode ser observado comparando-se os lados controle e transformado dos embriões (Figura 13). O fenótipo observado pode estar sugerindo que RGM-A atue *upstream* a Pax3 na regulação da formação da musculatura esquelética, mas não é possível definir se esta associação é direta ou indireta. RGM-A poderia estar regulando a expressão de Pax3 para a indução da saída no programa de proliferação celular dos mioblastos e início do programa de diferenciação muscular, embora nenhum efeito sobre o desenvolvimento normal da musculatura e sobre a expressão de Myf5 (marcador de diferenciação) tenha sido observado (Figura 13) após a transformação. Uma outra função biológica possível para RGM-A nos somitos pode estar sendo sugerida pelo efeito negativo observado sobre a expressão de EphA4 (Figura 13), fenótipo que pode estar associado à regulação do processo de adesão celular.

Os resultados obtidos corroboram para indicar uma associação de RGM-A com a formação da musculatura esquelética, ou pelo modelo En1/Sim1 de formação das musculaturas epaxial e hipaxial, ou pelos efeitos sobre Pax3, que é o principal regulador da miogênese de vertebrados. Entretanto, estes resultados não foram suficientes para concluir estas investigações funcionais. Os fenótipos devem ser revisados e outros ensaios precisam ser realizados para comprovar ou testar estes novos papéis biológicos para RGM-A. Ainda assim, estes resultados preliminares na caracterização de RGM-A foram suficientes para comprovar a eficiência da

abordagem genômica e da análise do padrão de expressão por microarranjos para indicar transcritos candidatos para estudos funcionais. RGM-A, antes caracterizado apenas no sistema nervoso, foi detectado com especificidade de expressão no tecido muscular esquelético, o que foi um padrão expressão inédito para estes transcritos. As análises funcionais demonstraram estar validada a abordagem empregada neste estudo, ressaltando o seu potencial e abrindo novas perspectivas para a caracterização desse e ou de outros transcritos nos sistemas biológicos.

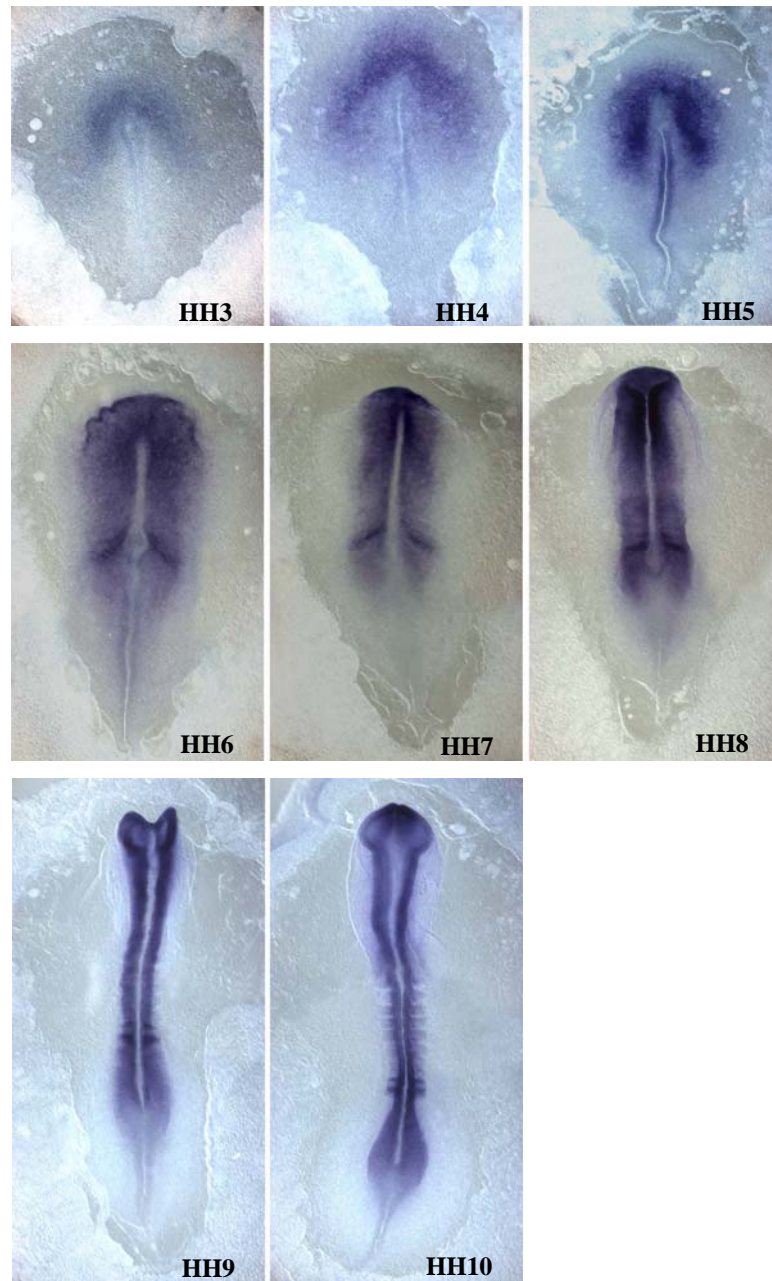


Figura 9 - Padrão de expressão de RGM-A entre os estádios HH3 e HH10 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*

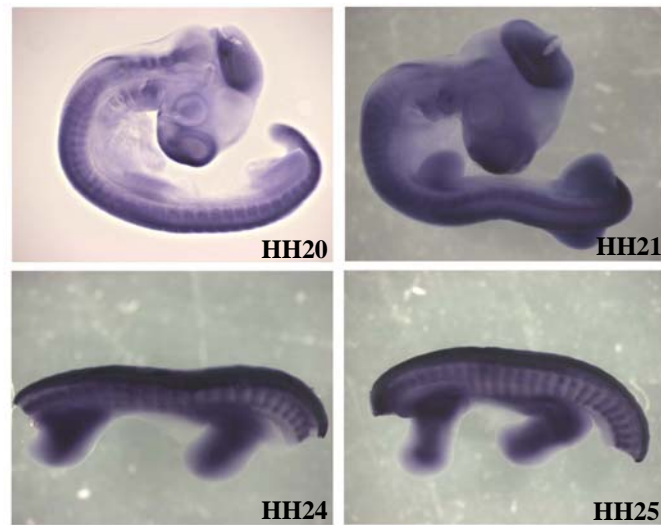


Figura 10 - Padrão de expressão de RGM-A em embriões de *Gallus gallus* nos estádios HH20, HH21, HH24 e HH25 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951)

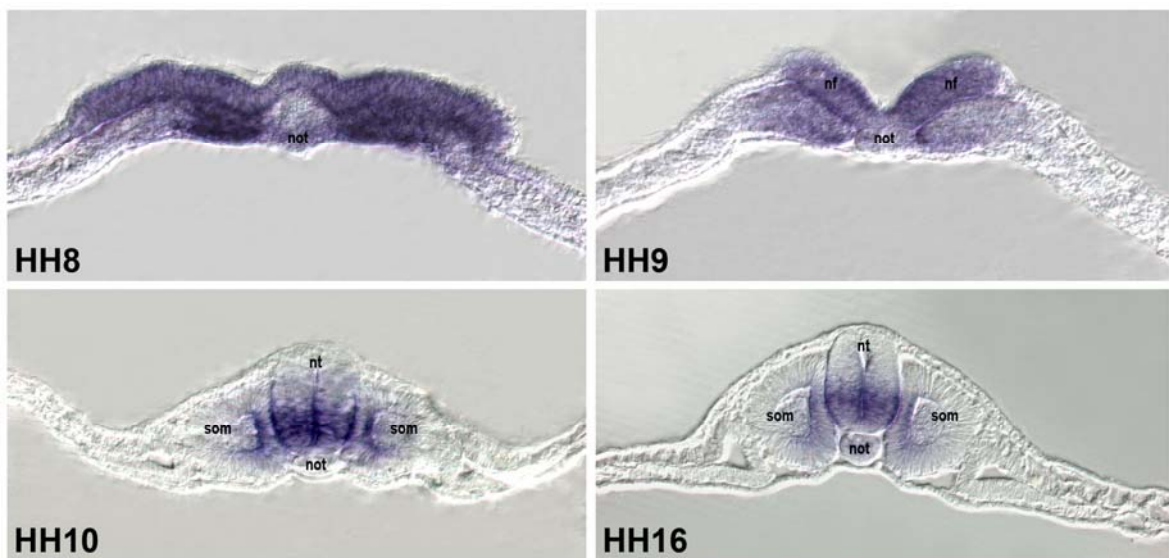


Figura 11 – Padrão de expressão de RGM-A em cortes transversais em nível torácico de embriões nos estádios HH8, HH9, HH10 e HH16 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Legenda: (nt) tubo neural; (som) somito; (not) notocorda; (nf) “dobra” neural

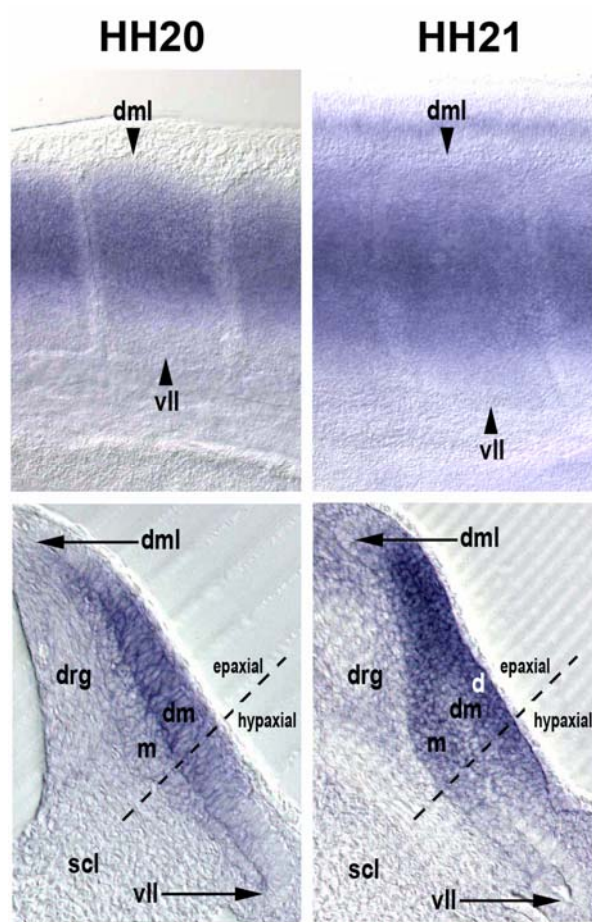


Figura 12 – Visão lateral (acima) e cortes transversais (abaixo) do padrão de expressão para RGM-A nos somitos de embriões de *Gallus gallus* nos estádios HH20 e HH21. Legenda: (**nt**) tubo neural; (**not**) notocorda; (**scl**) esclerótomo; (**dm**) dermomiótomo; (**dml**) dermomiótomo dorsomedial; (**vll**) dermomiótomo ventrolateral; (**m**) miótomo; (**drg**) raiz do gânglio dorsal

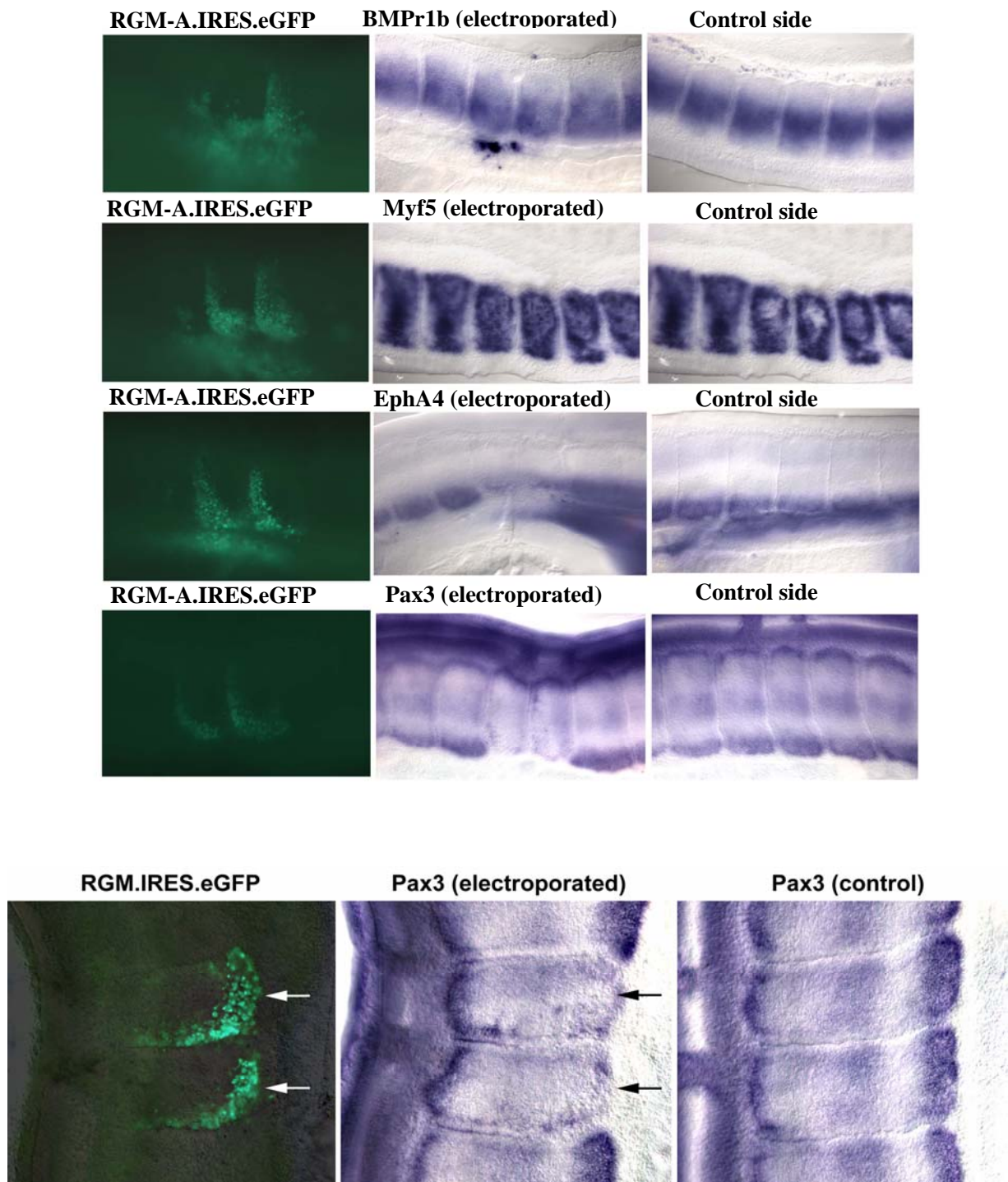


Figura 13 – Embriões transformados com a construção de expressão RGM-A.IRES.eGFP e efeitos sobre os marcadores **BMPr1b**, **Myf5**, **EphA4** e **Pax3**. Em detalhe os efeitos da super-expressão sobre o marcador Pax3. Setas em branco indicam a região hipaxial alvo dos somitos (coloração verde) e as em preto (coluna central), a afetada pela super-expressão de RGM-A

5 Conclusões

- A comparação dos perfis transcricionais da musculatura esquelética peitoral de frangos entre as linhagens de corte e de postura permitiu identificar transcritos candidatos, possivelmente associados às diferenças de potencial de deposição muscular e de crescimento das linhagens.
- A categoria funcional de transcritos associados à sinalização celular foi mais freqüente entre aqueles mais expressos na musculatura peitoral das aves de corte, selecionadas para o crescimento rápido. Por serem os transcritos responsáveis pela decodificação do sinal para a promover a deposição muscular no momento e local apropriados durante o desenvolvimento, esta categoria de fatores foi identificada como uma das mais influenciadas pelos programas de seleção de animais para melhoramento.
- A seqüência do genoma do frango permitiu identificar a localização de alguns dos transcritos diferencialmente expressos entre as linhagens, em regiões coincidentes àquelas anteriormente mapeadas para QTLs associados às características de produção em outras populações de frango.
- Esta associação das informações de expressão diferencial e do mapeamento de QTLs permitiu localizar os transcritos candidatos mais prováveis de conter mutações responsáveis ou associadas à variabilidade fenotípica observada na população para características de produção. Marcadores moleculares que permitam a identificação dessas mutações nas populações poderão potencialmente ser empregados para a seleção de animais superiores.

- Os perfis transcricionais obtidos entre os cinco tecidos amostrados permitiu a construção de banco de dados de expressão para 4.534 transcritos simultaneamente. Este banco de dados foi útil para a caracterização dos transcritos desconhecidos, por padrão de expressão tecido-específico.
- As análises de agrupamento realizadas com os padrões de expressão dos transcritos de frango entre cinco tecidos permitiram localizar transcritos desconhecidos como co-expressos àqueles que apresentaram padrão na musculatura esquelética.
- As análises funcionais *in vivo* de RGM-A em embriões de frango permitiram confirmar as indicações dos microarranjos, que sugeriram este orientador de axônio com padrão de expressão músculo esquelético-específico.
- Estas análises funcionais *in vivo* de RGM-A em embriões de frango indicaram uma possível associação deste orientador de axônio com a formação da musculatura esquelética dos vertebrados superiores.
- A abordagem adotada neste estudo foi eficiente para orientar a seleção de transcritos candidatos que serão úteis para que os programas de melhoramento sejam capazes de manter ou aumentar os índices de crescimento das aves, de forma a superar os limites impostos pelo perfil genético alcançado em anos de seleção.
- Novas perspectivas para a caracterização funcional *in vivo* de transcritos desconhecidos foram estabelecidas utilizando embriões de frango como modelo animal, por serem considerados mais apropriados para pesquisas em embriologia dentre os embriões de animais domésticos.

REFERÊNCIAS

ABDRAKHMANOV, I.; LODYGIN, D.; GEROTH, P.; ARAKAWA, H.; LAW, A.; PLACHY, J.; KORN, B.; BUERSTEDDE, J.M. A large database of chicken bursal ESTs as a resource for the analysis of vertebrate gene function. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 12, p. 2062-2069, 2000.

ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A.; McCOMBIE, W.R.; VENTER, J.C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, n. 5013, p.1651-1656, 1991.

ADOBE PHOTOSHOP. **Adobe Photoshop versão 7.0**. San Diego, 2002. 1 CD-ROM.

AFRAKHTE, M.; SCHULTHEISS, T.M. Construction and analysis of a subtracted library and microarray of cDNAs expressed specifically in chicken heart progenitor cells. **Developmental Dynamics**, New York, v. 230, n. 2, p. 290-298, 2004.

AHMED, M.; CHENG, L.; DIETRICH, S. The establishment of the epaxial-hypaxial boundary in the avian myotome. **Developmental Dynamics**, New York, v. 235, n. 7, p. 1884-1894, 2006.

ALVARES, L.E. **Quantificação da expressão dos fatores miogênicos e de Pax3 durante o desenvolvimento embrionário de aves**. 2001. 132 p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2001.

ALVARES, L.E.; MANTOANI, A.; CORRENTE, J.E.; COUTINHO, L.L. Standard-curve competitive RT-PCR quantification of myogenic regulatory factors in chicken embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 12, p. 1629-1641, 2003

ALVARES, L.E.; SCHUBERT, F.R.; THORPE, C.; MOOTOOSAMY, R.C.; CHENG, L.; PARKYN, G.; LUMSDEN, A.; DIETRICH, S. Intrinsic, Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 5, n. 3, p. 379-390, 2003.

ALVES, H.J. **Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte**. 2004. 103 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ANDERSSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature review. Genetics**, London, v. 2, n. 2, p. 130-138, 2001.

ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 5, n. 3, p. 202-212, 2004.

ANDRES, D.A.; SEABRA, M.C.; BROWN, M.S.; ARMSTRONG, S.A.; SMELAND, T.E.; CREMERS, F.P.; GOLDSTEIN, J.L. cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. **Cell**, Cambridge, v. 73, n. 6, p. 1091-1099, 1993.

AOYAMA, Y.; URUSHIYAMA, S.; YAMADA, M.; KATO, C.; IDE, H.; HIGUCHI, S.; AKIYAMA, T.; SHIBUYA, H. MFB-1, an F-box-type ubiquitin ligase, regulates TGF-beta signaling. **Genes to Cells**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 1093-1101, 2004.

ARIMURA, T.; HAYASHI, T.; TERADA, H.; LEE, S.Y.; ZHOU, Q.; TAKAHASHI, M.; UEDA, K.; NOUCHI, T.; HOHDA, S.; SHIBUTANI, M.; HIROSE, M.; CHEN, J.; PARK, J.E.; YASUNAMI, M.; HAYASHI, H.; KIMURA, A. A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 8, p. 6746-6752, 2004.

ARNOLD, H.H.; BRAUN, T. Genetics of muscle determination and development. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 48, p. 129-164, 2000.

ARRAYVISION. **Array vision evaluation 6.0**. Ontario, 2006, Disponível em:
<<http://www.imagingresearch.com/products/ARV.asp>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

AUGUSTINE, C.; GUNNERSEN, J.; SPIRKOSKA, V.; TAN, S.S. Place- and time-dependent expression of mouse sFRP-1 during development of the cerebral neocortex. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 109, n. 2, p. 395-397, 2001.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Disponível em:
<<http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/home.asp>>. Acesso em 03 jul. 2006.

BABITT, J.L.; ZHANG, Y.; SAMAD, T.A.; XIA, Y.; TANG, J.; CAMPAGNA, J.A.; SCHNEYER, A.L.; WOOLF, C.J.; LIN, H.Y. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 33, p. 29820-29827, 2005.

BACHEM, C.W.; VAN DER HOEVEN, R.S.; DE BRUIJN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 745-753, 1996.

BAJANCA, F.; THORSTEINSDOTTIR, S. Integrin expression patterns during early limb muscle development in the mouse. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 119, suppl. 1, p. S131-134, 2002.

BARON, E.E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. 2004. 96p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BENGAL, E.; RANSONE, L.; SCHARFMANN, R.; DWARKI, V.J.; TAPSCOTT, S.J.; WEINTRAUB, H.; VERMA, I.M. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. **Cell**, Cambridge, v. 68, n. 3, p. 507-519, 1992.

BIRCHMEIER, C.; BROHMANN, H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 12, n. 6, p. 725-730, 2000.

BLADT, F.; RIETHMACHER, D.; ISENMANN, S.; AGUZZI, A.; BIRCHMEIER, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. **Nature**, London, v. 376, n. 6543, p. 768-771, 1995.

BLAST. BASIC LOCAL ALIGNMENT TOOL. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

BLISS, T.W.; DOHMS, J.E.; EMARA, M.G.; KEELER, C.L. JR. Gene expression profiling of avian macrophage activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 105, n. 3/4, p. 289-299, 2005.

BLOTT, S.; KIM, J.J.; MOISIO, S.; SCHMIDT-KUNTZEL, A.; CORNET, A.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; FORD, C.; GRISART, B.; JOHNSON, D.; KARIM, L.; SIMON, P.; SNELL, R.; SPELMAN, R.; WONG, J.; VILKKI, J.; GEORGES, M.; FARNIR, F.; COPPIETERS, W. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. **Genetics**, Austin, v. 163, n. 1, p. 253-266, 2003.

BOARDMAN, P.E.; SANZ-EZQUERRO, J.; OVERTON, I.M.; BURT, D.W.; BOSCH, E.; FONG, W.T.; TICKLE, C.; BROWN, W.R.; WILSON, S.A.; HUBBARD, S.J. A comprehensive collection of chicken cDNAs. **Current Biology**, London, v. 12, n. 22, p. 1965-1969, 2002.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRAND-SABERI, B. Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. **Annals of Anatomy**, Jena, v. 187, n. 3, p. 199-207, 2005.

BRAND-SABERI, B.; KRENN, V.; GRIM, M.; CHRIST, B. Differences in the fibronectin-dependence of migrating cell populations. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 187, n. 1, p. 17-26, 1993.

BRAUN, T.; ARNOLD, H.H. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 1176-1186, 1995.

BCCC. BRAZILIAN CLONE COLLECTION CENTER. Disponível em:
<<http://www.bcccenter.fcav.unesp.br>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

BREUZA, L.; HALBEISEN, R.; JENO, P.; OTTE, S.; BARLOWE, C.; HONG, W.; HAURI, H.P. Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 45, p. 47242-47253, 2004.

BRINKS, H.; CONRAD, S.; VOGT, J.; OLDEKAMP, J.; SIERRA, A.; DEITINGHOFF, L.; BECHMANN, I.; ALVAREZ-BOLADO, G.; HEIMRICH, B.; MONNIER, P.P.; MUELLER, B.K.; SKUTELLA, T. The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 15, p. 3862-3869, 2004.

BROWN, C.B.; ENGLEKA, K.A.; WENNING, J.; MIN LU, M.; EPSTEIN, J.A. Identification of a hypaxial somite enhancer element regulating Pax3 expression in migrating myoblasts and characterization of hypaxial muscle Cre transgenic mice. **Genesis**, New York, v. 41, n. 4, p. 202-209, 2005.

BROWN, W.R.; HUBBARD, S.J.; TICKLE, C.; WILSON, S.A. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 4, n. 2, p. 87-98, 2003.

BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, London, v. 202, n. 1, p. 59-68, 2003.

BURNSIDE, J.; NEIMAN, P.; TANG, J.; BASOM, R.; TALBOT, R.; ARONSZAJN, M.; BURT, D.; DELROW, J. Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 1, p. 13-23, 2005.

BURKE, W.H.; HENRY, M.H. Characteristics of the pectoralis superficialis and semimembranosus of broiler strain chickens, bantam chickens, and the reciprocal crosses. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 767-773, 1997.

BURT, D.W. Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 58, p.5-13, 2002.

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

BUSTIN, S.A.; NIE, X.F.; BARNARD, R.C.; KUMAR, V.; PASCALL, J.C.; BROWN, K.D.; LEIGH, I.M.; WILLIAMS, N.S.; MCKAY, I.A. Cloning and characterization of ERF-1, a human member of the Tis11 family of early-response genes. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 13, n. 5, p. 449-459, 1994.

CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 86-98, 2004.

CALVO, S.; VENEPALLY, P.; CHENG, J.; BUONANNO, A. Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 19, n. 1, p. 515-525, 1999.

CAMARDA, G.; SIEPI, F.; PAJALUNGA, D.; BERNARDINI, C.; ROSSI, R.; MONTECUCCO, A.; MECCIA, E.; CRESCENZI, M. A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 187, n. 3, p. 417-423, 2004.

CARLBORG, O.; KERJE, S.; SCHUTZ, K.; JACOBSSON, L.; JENSEN, P.; ANDERSSON, L. A global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 3, p. 413-421, 2003.

CHAUDHURI, T.; MUKHERJEA, M.; SACHDEV, S.; RANDALL, J.D.; SARKAR, S. Role of the fetal and alpha/beta exons in the function of fast skeletal troponin T isoforms: correlation with altered Ca²⁺ regulation associated with development. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 352, n. 1, p. 58-71, 2005.

CHENG, L.; ALVARES, L.E.; AHMED, M.U.; EL-HANFY, A.S.; DIETRICH, S. The epaxial-hypaxial subdivision of the avian somite. **Developmental Biology**, San Diego, v. 274, n. 2, p. 348-369, 2004.

CHILTON, J.K. Molecular mechanisms of axon guidance. **Developmental Biology**, San Diego, v. 292, n. 1, p. 13-24, 2006.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHRIST, B.; BRAND-SABERI, B. Limb muscle development. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 46, n. 7, p. 905-914, 2002.

CHRIST, B.; ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 191, n. 5, p. 381-396, 1995.

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 302-308, 2006.

CLEMENT, K.; VIGUERIE, N.; DIEHN, M.; ALIZADEH, A.; BARBE, P.; THALAMAS, C.; STOREY, J.D.; BROWN, P.O.; BARSH, G.S.; LANGIN, D. In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 2, p. 281-291, 2002.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília, DF: Embrapa, 2001, chap. 1, p. 12-24.

COUTINHO, L.L.; MORRIS, J.; MARKS, H.L.; BUHR, R.J.; IVARIE, R. Delayed somite formation in a quail line exhibiting myofiber hyperplasia is accompanied by delayed expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chain. **Development**, Cambridge, v. 117, n. 2, p. 563-569, 1993.

DAN, I.; WATANABE, N.M.; KUSUMI, A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 220-230, 2001.

DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 3, n. 1, p. 22-32, 2002.

DE KONING, D.J.; WINDSOR, D.; HOCKING, P.M.; BURT, D.W.; LAW, A.; HALEY, C.S.; MORRIS, A.; VINCENT, J.; GRIFFIN, H. Quantitative trait locus detection in commercial broiler lines using candidate regions. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p.1158-1165, 2003.

DELFINI, M.C.; HIRSINGER, E.; POURQUIE, O.; DUPREZ, D. Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 23, p. 5213-5224, 2000.

DELGADO, I.; HUANG, X.; JONES, S.; ZHANG, L.; HATCHER, R.; GAO, B.; ZHANG, P. Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. **Genomics**, San Diego, v. 82, n. 2, p. 109-121, 2003.

DENETCLAW, W.F.; ORDAHL, C.P. The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 4, p. 893-905, 2000.

DIETRICH, S. Regulation of hypaxial muscle development. **Cell and Tissue Research**, Berlin/Heidelberg, v. 296, n. 1, p. 175-182, 1999.

DIETRICH, S.; SCHUBERT, F.R.; LUMSDEN, A. Control of dorsoventral pattern in chick paraxial mesoderm. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 19, p. 3895-3908, 1997.

DIETRICH, S.; SCHUBERT, F.R.; HEALY, C.; SHARPE, P.T.; LUMSDEN, A. Specification of the hypaxial musculature. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 12, p. 2235-2249, 1998.

DOERKS T, HUBER S, BUCHNER E, BORK P. BSD: a novel domain in transcription factors and synapse-associated proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 168-170, 2002.

DUFRESNE, A.M.; SMITH, R.J. The adapter protein GRB10 is an endogenous negative regulator of insulin-like growth factor signaling. **Endocrinology**, Baltimore, v. 146, n. 10, p. 4399-4409, 2005.

DUGGAN, D.J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature genetics**, London, v. 21, suppl. 1, p. 10-14, 1999.

EGEA, J.; NISSEN, U.V.; DUFOUR, A.; SAHIN, M.; GREER, P.; KULLANDER, K.; MRSIC-FLOGEL, T.D.; GREENBERG, M.E.; KIEHN, O.; VANDERHAEGHEN, P.; KLEIN, R. Regulation of EphA 4 kinase activity is required for a subset of axon guidance decisions suggesting a key role for receptor clustering in Eph function. **Neuron**, Cambridge, v. 47, n. 4, p. 515-528, 2005.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 25, p. 14863-14868, 1998.

EMBRAPA. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

FAN, C.M.; LEE, C.S.; TESSIER-LAVIGNE, M. A role for WNT proteins in induction of dermomyotome. **Development Biology**, New York, v. 191, n. 1, p. 160-165, 1997.

FARACI, F.M.; DIDION, S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 24, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

FINLAY, G.A.; PARKER, A.; FELLOW, B.F.; YORK, B.; KARAS, R.H.; FANBURG, B.L.; ZHANG, H.; KWIATKOWSKI, D.J.; NOONAN, D.J. Estrogen-induced smooth muscle cell growth is regulated by Tuberin and associated with altered activation of platelet-derived growth factor receptor- β and ERK-1/2*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.279. n. 22, p. 23114-23122, 2004.

FUCHTBAUER, E.M. Expression of M-twist during postimplantation development of the mouse. **Developmental Dynamics**, New York, v. 204, n. 3, p. 316-322, 1995.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, Washington, v. 253, n. 5018, p. 448-451, 1991.

GABRIEL, J.E. **Estudo da expressão temporal e espacial de genes associados à miogênese durante o desenvolvimento embrionário de aves**. 2001. 118p. Tese (Doutorado em ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP, Piracicaba, SP, 2001.

GALE, N.W.; HOLLAND, S.J.; VALENZUELA, D.M.; FLENNIKEN, A.; PAN, L.; RYAN, T.E.; HENKEMEYER, M.; STREBHARDT, K.; HIRAI, H.; WILKINSON, D.G.; PAWSON, T.; DAVIS, S.; YANCOPOULOS, G.D. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclass and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. **Neuron**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 9-19, 1996.

GASCH, A.P., SPELLMAN, P.T., KAO, C.M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M.B., STORZ, G., BOTSTEIN, D., BROWN, P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 11, n. 12, p. 4241-4257, 2000.

GENE ONTOLOGY. Disponível em: < <http://www.geneontology.org/>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

GENESPRING. **GeneSpring GX 7.3.1**. Palo Alto, 2001. Disponível em:

< <http://www.silicongenetics.com>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

GEPTS, P. Ten thousand years of crop evolution. In: CHRISPEELS, M.J.; SADAVA, D.E.

Plants, genes and crop biotechnology. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett publishers, 2003, chap. 13, p. 328-359.

GOTTARDI, C.J.; GUMBINER, B.M. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 167, n. 2, p. 339-349, 2004.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DACALLONE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 386-401, 2001.

GOULDING, M.; LANUZA, G.; SAPIR, T.; NARAYAN, S. The formation of sensorimotor circuits. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 12, n. 5, p. 508-515, 2002.

GREFERATH, U.; CANTY, A.J.; MESSENGER, J.; MURPHY, M. Developmental expression of EphA4-tyrosine kinase receptor in the mouse brain and spinal cord. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 119, suppl. 1, p. 231-238, 2002.

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; KARIM, L.; FORD, C.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; MNI, M.; REID, S.; SIMON, P.; SPELMAN, R.; GEORGES, M.; SNELL, R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 2, p. 222-231, 2002.

- GROBET, L.; MARTIN, L.J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, London, v. 17, n. 1, p. 71-74, 1997.
- GROS, J.; SCAAL, M.; MARCELLE, C. A two-step mechanism for myotome formation in chick. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 6, n. 6, p. 875-882, 2004.
- HAL, N.L.W. van; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A.; KOK, E.J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A.; KEIJER, J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 271-280, 2000.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, New York, v. 88, p. 49-92, 1951.
- HAMILTON, K.L.; QUINDRY, J.C.; FRENCH, J.P.; STAIB, J.; HUGHES, J.; MEHTA, J.L.; POWERS, S.K. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 37, n. 9, p. 1360-1368, 2004.
- HARLIZIUS, B.; VAN WIJK, R.; MERKS, J.W. Genomics for food safety and sustainable animal production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 113, n. 1/3, p. 33-42, 2004.
- HARRINGTON, C.A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 285-291, 2000.
- HASTY, P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J.H.; EDMONDSON, D.G.; VENUTI, J.M.; OLSON, E.N.; KLEIN, W.H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, London, v. 364, n. 6437, p. 501-506, 1993.

HATEY, F.; TOSSER-KLOPP, G.; MARTINATO, C.C.; MULSANT, P.; GASSER, F. Expressed sequence tags for genes: a review. **Genetics Selection and Evolution**, Paris, v. 30, p. 521-554, 1998.

HAYASHI, K.; HAYASHI, M.; JALKANEN, M.; FIRESTONE, J.H.; TRELSTAD, R.L.; BERNFIELD, M. Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 35, p. 1079–1088, 1987.

HEDGES, S.B. The origin and evolution of model organisms. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 3, n. 11, p. 838-849, 2002

HEIDEBRECHT, H.J.; BUCK, F.; STEINMANN, J.; SPRENGER, R.; WACKER, H.H.; PARWARESCH, R. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. **Blood**, New York, v. 90, n. 1, p. 226-233, 1997.

HEMERT, S. van; EBBELAAR, B.H.; SMITS, M.A.; REBEL, J.M. Generation of EST and microarray resources for functional genomic studies on chicken intestinal health. **Animal Biotechnology**, New York, v. 14, n. 2, p. 133-143, 2003.

HERVÉ, C.; PERRET, E.; TREMOUSAYGUE, D.; LESCURE, B. Differential screening using high density filters reveals a dramatic change in gene expression at different growth fase in *Arabidopsis* cell suspension cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 34, n. 3, p. 425-430, 1996.

HILLIER, L.W.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R.C.; PONTING, C.P.; BORK, P.; BURT, D.W.; GROENEN, M.A.; DELANY, M.E.; DODGSON, J.B.; CHINWALLA, A.T.; CLIFTEN, P.F.; CLIFTON, S.W.; DELEHAUNTY, K.D.; FRONICK, C.; FULTON, R.S.; GRAVES, T.A.; KREMITZKI, C.; LAYMAN, D.; MAGRINI, V.; MCPHERSON, J.D.; MINER, T.L.; MINX, P.; NASH, W.E.; NHAN, M.N.; NELSON, J.O.; ODDY, L.G.; POHL, C.S.; RANDALL-MAHER, J.; SMITH, S.M.; WALLIS, J.W.; YANG, S.P.; ROMANOV, M.N.; RONDELLI, C.M.; PATON, B.; SMITH, J.; MORRICE, D.; DANIELS, L.; TEMPEST, H.G.; ROBERTSON, L.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; JACOBSSON, L.; KERJE, S.; ANDERSSON, L.; CROOIJMANS, R.P.; AERTS, J.; VAN DER POEL, J.J.; ELLEGREN, H.; CALDWELL, R.B.; HUBBARD, S.J.; GRAFHAM, D.V.; KIERZEK, A.M.; MCLAREN, S.R.; OVERTON, I.M.; ARAKAWA, H.; BEATTIE, K.J.; BEZZUBOV, Y.; BOARDMAN, P.E.; BONFIELD, J.K.; CRONING, M.D.; DAVIES, R.M.; FRANCIS, M.D.; HUMPHRAY, S.J.; SCOTT, C.E.; TAYLOR, R.G.; TICKLE, C.; BROWN, W.R.; ROGERS, J.; BUERSTEDDE, J.M.; WILSON, S.A.; STUBBS, L.; OVCHARENKO, I.; GORDON, L.; LUCAS, S.; MILLER, M.M.; INOKO, H.; SHIINA, T.; KAUFMAN, J.; SALOMONSEN, J.; SKJOEDT, K.; WONG, G.K.; WANG, J.; LIU, B.; WANG, J.; YU, J.; YANG, H.; NEFEDOV, M.; KORIABINE, M.; DEJONG, P.J.; GOODSTADT, L.; WEBBER, C.; DICKENS, N.J.; LETUNIC, I.; SUYAMA, M.; TORRENTS, D.; VON MERING, C.; ZDOBNOV, E.M.; MAKOVA, K.; NEKRUTENKO, A.; ELNITSKI, L.; ESWARA, P.; KING, D.C.; YANG, S.; TYEKUCHEVA, S.; RADAKRISHNAN, A.; HARRIS, R.S.; CHIAROMONTE, F.; TAYLOR, J.; HE, J.; RIJNKELS, M.; GRIFFITHS-JONES, S.; URETA-VIDAL, A.; HOFFMAN, M.M.; SEVERIN, J.; SEARLE, S.M.; LAW, A.S.; SPEED, D.; WADDINGTON, D.; CHENG, Z.; TUZUN, E.; EICHLER, E.; BAO, Z.; FLICEK, P.; SHTEYNBERG, D.D.; BRENT, M.R.; BYE, J.M.; HUCKLE, E.J.; CHATTERJI, S.; DEWEY, C.; PACHTER, L.; KOURANOV, A.; MOURELATOS, Z.; HATZIGEORGIOU, A.G.; PATERSON, A.H.; IVARIE, R.; BRANDSTROM, M.; AXELSSON, E.; BACKSTROM, N.; BERLIN, S.; WEBSTER, M.T.; POURQUIE, O.; REYMOND, A.; UCLA, C.; ANTONARAKIS, S.E.; LONG, M.; EMERSON, J.J.; BETRAN, E.; DUPANLOUP, I.; KAESSMANN, H.; HINRICHS, A.S.; BEJERANO, G.; FUREY, T.S.; HARTE, R.A.; RANEY, B.; SIEPEL, A.; KENT, W.J.; HAUSSLER, D.; EYRAS, E.; CASTELO, R.; ABRIL, J.F.; CASTELLANO, S.; CAMARA, F.; PARRA, G.; GUIGO, R.; BOURQUE, G.; TESLER, G.; PEVZNER, P.A.; SMIT, A.; FULTON, L.A.; MARDIS, E.R.; WILSON, R.K. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, London, v. 432, n. 7018, p. 695-716, 2004.

HOCKING, P.M. Review of QTL mapping results in chickens. *World's Poultry Science Journal*, Ithaca, v. 61, p. 215-226, 2005.

HUANG, R.; ZHI, Q.; NEUBUSER, A.; MULLER, T.S.; BRAND-SABERI, B.; CHRIST, B.; WILTING, J. Function of somite and somitocoele cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryos. *Acta Anatomica*, Basel, v. 155, n. 4, p. 231-41, 1996.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

HUBBARD, S.J.; GRAFHAM, D.V.; BEATTIE, K.J.; OVERTON, I.M.; MCLAREN, S.R.; CRONING, M.D.; BOARDMAN, P.E.; BONFIELD, J.K.; BURNSIDE, J.; DAVIES, R.M.; FARRELL, E.R.; FRANCIS, M.D.; GRIFFITHS-JONES, S.; HUMPHRAY, S.J.; HYLAND, C.; SCOTT, C.E.; TANG, H.; TAYLOR, R.G.; TICKLE, C.; BROWN, W.R.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; WILSON, S.A. Transcriptome analysis for the chicken based on 19,626 finished cDNA sequences and 485,337 expressed sequence tags. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 1, p. 174-183, 2005.

IKEOBI, C.O.N.; WOOLLIAMS, J.A.; MORRICE, D.R.; LAW, A.; WINDSOR, D.; BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Quantitative trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 87, p. 143-151, 2004.

ITASAKI, N.; BEL-VIALAR, S.; KRUMLAUF, R. 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and *in ovo* gene expression. **Nature Cell Biology**, London, v. 1, n. 8, p. E203-207, 1999.

JENNEN, D.G.; VEREIJKEN, A.L.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, R.P.; VEENENDAAL, A.; VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A. Detection and localization of quantitative trait loci affecting fatness in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 295-301, 2004.

JEON, J.T.; CARLBORG, O.; TORNSTEN, A.; GIUFFRA, E.; AMARGER, V.; CHARDON, P.; ANDERSSON-EKLUND, L.; ANDERSSON, K.; HANSSON, I.; LUNDSTROM, K.; ANDERSSON, L. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. **Nature Genetics**, London, v. 21, n. 2, p. 157-158, 1999.

JEONG, K.H.; CHIN, W.W.; KAISER, U.B. Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 14, p. 6127-6139, 2004.

JIN, Z.Q.; ZHOU, H.Z.; CECCHINI, G.; GRAY, M.O.; KARLINER, J.S. MnSOD in mouse heart: acute responses to ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 6, p. H2986-2994, 2005.

JORGE, E.C.; MONTEIRO-VITORELO, C.B.; ALVES, H.J.; SILVA, C.S.; BALAN, R.G.; PATRÍCIO, M.; COUTINHO, L.L. EST analysis of mRNA expressed during embryogenesis in *Gallus gallus*. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 48, p. 333-337, 2004.

KAAM, J.B.C.H.M. van; VAN ARENDONK, J.A.M.; GROENEN, M.A.M.; BOVENHUIS, H.; VEREIJKEN, A.L.J.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VAN DER POEL, J.J.; VEENENDAAL, A. Whole genome scan for quantitative trait loci affecting body weight in chickens using a three generation design. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 54, p. 133-150, 1998.

KABLAR, B.; KRASTEL, K.; TAJBAKSH, S.; RUDNICKI, M.A. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. **Developmental Biology**, San Diego, v. 258, n. 2, p. 307-318, 2003.

KABLAR, B.; RUDNICKI, M.A. Development in the absence of skeletal muscle results in the sequential ablation of motor neurons from the spinal cord to the brain. **Developmental Biology**, San Diego, v. 208, n. 1, p. 93-109, 1999.

KATO, M.; WANG, H.; KAINULAINEN, V.; FITZGERALD, M.L.; LEDBETTER, S.; ORNITZ, D.M.; BERNFIELD, M. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. **Nature Medicine**. London, v. 4, n. 6, p. 691-697, 1998.

KATOH, Y.; KATOH, M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 17, n. 1, p. 171-175, 2006.

KERJE, S.; CARLBORG, O.; JACOBSSON, L.; SCHUTZ, K.; HARTMANN, C.; JENSEN, P.; ANDERSSON, L. The twofold difference in adult size between the red junglefowl and White Leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 264-274, 2003.

KERR, M.K.; CHURCHILL, G.A. Analysis of variance for gene expression microarray data. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, p. 819-837, 2000.

KERR, M.K.; CHURCHILL, A.G. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. **Genetical Research**, London, v. 77, p. 123-128, 2001.

KERR, M.K.; AFSHARI, C.A.; BENNET, L.; BUSHEL, P.; MARTINEZ, J.; WALKER, J.N.; CHURCHILL, G. Statistical analysis of a gene expression microarray experiment with replication. **Statistica**, Bologna, v. 12, p. 203-217, 2002.

KIEFER, J.C.; HAUSCHKA, S.D. Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV. **Developmental Biology**, San Diego, v. 232, n. 1, p. 77-90, 2001.

KITAMURA, Y.; KITAMURA, T.; SAKAUE, H.; MAEDA, T.; UENO, H.; NISHIO, S.; OHNO, S.; OSADA, S.; SAKAUE, M.; OGAWA, W.; KASUGA, M. Interaction of Nck-associated protein 1 with activated GTP-binding protein Rac. **The Biochemical Journal**, London, v. 322, p. 873-878, 1997.

KITZMANN, M.; BONNIEU, A.; DURET, C.; VERNUS, B.; BARRO, M.; LAOUDJ-CHENIVESSE, D.; VERDI, J.M.; CARNAC, G. Inhibition of Notch signaling induces myotube hypertrophy by recruiting a subpopulation of reserve cells. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 208, n. 3, p. 538-548, 2006.

KLINKE, S.L.; CHEESEMAN, I.M.; HORI, T.; FUKAGAWA, T.; DESAI, A. The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 173, n. 1, p. 9-17, 2006.

KRAFT, A.D.; JOHNSON, D.A.; JOHNSON, J.A. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 5, p. 1101-1112, 2004.

KRENN, V.; BRAND-SABERI, B.; WACHTLER, F. Hyaluronic acid influences the migration of myoblasts within the avian embryonic wing bud. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 192, n. 4, p. 400-406, 1991.

KRUMMREI, U.; BANG, R.; SCHMIDTCHEN, R.; BRUNE, K.; BANG, H. Cyclophilin-A is a zinc-dependent DNA binding protein in macrophages. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 371, n. 1, p. 47-51, 1995.

KUNINGER, D.; KUZMICKAS, R.; PENG, B.; PINTAR, J.E.; ROTWEIN, P. Gene discovery by microarray: identification of novel gene induced during growth factor mediated muscle cell survival and differentiation. **Genomics**, San Diego, v. 84, n. 5, p. 876-889, 2004.

LANDMESSER, L.; HONIG, M.G. Altered sensory projections in the chick hind limb following the early removal of motoneurons. **Developmental Biology**, San Diego, v. 118, n. 2, p. 511-531, 1986.

LASSAR, A.; MUNSTERBERG, A. Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 432-442, 1994.

LASSAR, A.B.; DAVIS, R.L.; WRIGHT, W.E.; KADESCH, T.; MURRE, C.; VORONOVA, A.; BALTIMORE, D.; WEINTRAUB, H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins *in vivo*. **Cell**, Cambridge, v. 66, n. 2, p. 305-315, 1991.

LEDUR, M.C.; BERTANI, G.R.; NONES, K. Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. In: APINCO. CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas:FACTA, 2003. p. 87-105.

LEIMEISTER, C.; STEIDL, C.; SCHUMACHER, N.; ERHARD, S.; GESSLER, M. Developmental expression and biochemical characterization of Emu family members. **Developmental Biology**, San Diego, v. 249, n. 2, p. 204-218, 2002.

LI, L.; HELLER-HARRISON, R.; CZECH, M.; OLSON, E.N. Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 12, n. 10, p. 4478-4485, 1992.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage**, mapping and QTL analysis. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611p.

LIU, Y.P.; WU, G.S.; YAO, Y.G.; MIAO, Y.W.; LUIKART, G.; BAIG, M.; BEJA-PEREIRA, A.; DING, Z.L.; PALANICHAMY, M.G.; ZHANG, Y.P. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 38, n. 1, p. 12-19, 2006.

LUDOLPH, D.C.; KONIECZNY, S.F. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1595-1604, 1995.

MALI, M.; ELENIOUS, K.; MIETTINEN, H.M.; JALKANEN, M. Inhibition of basic fibroblast growth factor-induced growth promotion by over expression of syndecan-1. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 32, p. 24215–24222 ,1993.

MAMMUCARI, C.; TOMMASI DI VIGNANO, A.; SHAROV, A.A.; NEILSON, J.; HAVRDA, M.C.; ROOP, D.R.; BOTCHKAREV, V.A.; CRABTREE, G.R.; DOTTO, G.P. Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 665-676, 2005.

MANUEL, A.; BEAUPAIN, D.; ROMEO, P.H.; RAICH, N. Molecular characterization of a novel gene family (PHTF) conserved from *Drosophila* to mammals. **Genomics**, San Diego, v. 64, n. 2, p. 216-220, 2000.

MARCIL, A.; DUMONTIER, E.; CHAMBERLAND, M.; CAMPER, S.A.; DROUIN, J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 1, p. 45-55, 2003.

MASANA, M.I.; BROWN, R.C.; PU, H.; GURNEY, M.E.; DUBOCOVICH, M.L. Cloning and characterization of a new member of the G-protein coupled receptor EDG family. **Receptors Channels**, Yverdon, v. 3, n. 4, p. 255-262, 1995.

MATSUNAGA, E.; CHEDOTAL, A. Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. **Development, Growth & Differentiation**, Nagoya, v. 46, n. 6, p. 481-486, 2004.

MATSUNAGA, E.; TAUSZIG-DELAMASURE, S.; MONNIER, P.P.; MUELLER, B.K.; STRITTMATTER, S.M.; MEHLEN, P.; CHÉDOTAL, A. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. **Nature Cell Biology**, London, v. 6, n. 8, p. 749-756, 2004.

MAWDSLEY, D.J.; COOPER, H.M.; HOGAN, B.M.; CODY, S.H.; LIESCHKE, G.J.; HEATH, J.K. The netrin receptor neogenin is required for neural tube formation and somitogenesis in zebrafish. **Developmental Biology**, San Diego, v. 269, n. 1, p. 302-315, 2004.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. (Ed.) **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. cap. 1, p. 1-22.

MONNIER, P.P.; SLERRA, A.; MACCHL, P.; DELTINGHOFF, L.; ANDERSEN, J.S.; MANN, M.; FLAD, M.; HORNBERGER, M.R.; STAHL, B.; BONHOEFFER, F.; MUELLER, B. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. **Nature**, London, v. 419, p. 392-395, 2002.

MOOTOOSAMY, R.C.; DIETRICH, S. Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis. **Development**, Cambridge, v. 129, n. 3, p. 573-583, 2002.

MOSS, E.P. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in domestic fowl. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 122, p. 555-564, 1968.

MOTT, I.W.; IVARIE, R. cDNA array analysis of Japanese quail lines divergently selected for four-week body weight. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 9, p. 1524-1529, 2004.

MURGIA, M.; SERRANO, A.L.; CALABRIA, E.; PALLAFACCHINA, G.; LOMO, T.; SCHIAFFINO, S. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. **Nature Cell Biology**, London, v. 2, n. 3, p. 142-147, 2000.

NAGAYA, M.; INOHAYA, K.; IMAI, Y.; KUDO, A. Expression of *zisp*, a DHHC zinc finger gene, in somites and lens during *zebrafish* embryogenesis. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 119, suppl. 1, p. S311-314, 2002.

NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 03 jul. 2006.

NEIMAN, P.E.; RUDDELL, A.; JASONI, C.; LORING, G.; THOMAS, S.J.; BRANDVOLD, K.A.; LEE, R.M.; BURNSIDE, J.; DELROW, J. Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 11, p. 6378-6383, 2001.

NETPRIMER. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>>. Acesso em 09 de jul. de 2006.

NEZER, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B.; COPPIETERS, W.; DETILLEUX, J.; HANSET, R.; KARIM, L.; KVASZ, A.; LEROY, P.; GEORGES, M. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. **Nature Genetics**, London, v. 21, n. 2, p. 155-156, 1999.

NIEDERKOFER, V.; SALIE, R.; SIGRIST, M.; ARBER, S. Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 4, p. 808-818, 2004.

NIEHRS, C.; POLLET, N. Synexpression groups in eukaryotes. **Nature**, London, v. 402, n. 6761, p. 483-487, 1999.

NIKOVITS, W.J.R.; CANN, G.M.; HUANG, R.; CHRIST, B.; STOCKDALE, F.E. Patterning of fast and slow fibers within embryonic muscles is established independently of signals from the surrounding mesenchyme. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 13, p. 2537-2544, 2001.

NOGUCHI, K.; ISHII, S.; SHIMIZU, T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 28, p. 25600-25606, 2003.

NONES, K. **Mapeamento de QTLs no cromossomo 1 de Gallus gallus que influenciam características de desempenho e carcaça**. 2004. 110p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MELO, C.M.; MOURA, A.S.; ZANELLA, E.L.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 95-100, 2006.

OLSON, E.N.; WILLIAMS, R.S. Calcineurin signaling and muscle remodeling. **Cell**, Cambridge, v. 101, n. 7, p. 689-692, 2000.

OMIA. ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS. Disponível em: <<http://omia.angis.org.au/>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

ORDAHL, C.P.; LE DOUARIN, N.M. Two myogenic lineages within the developing somite. **Development**, Cambridge, v. 114, n. 2, p. 339-353, 1992.

ORDAHL, C.P.; BERDOUGO, E.; VENTERS, S.J.; DENETCLAW, W.F. JR. The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 10, p. 1731-1744, 2001.

PALMIERI, L.; ALBERIO, S.; PISANO, I.; LODI, T.; MEZMARIC-PETRUSA, M.; ZIDAR, J.; SANTORO, A.; SCARCIA, P.; FONTANESI, F.; LAMANTEA, E.; FERRERO, I.; ZEVIANI, M. Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 20, p. 3079-3088, 2005.

PASCUAL, A.; CHAMINADE, M.; PREAT, T. Ethanolamine kinase controls neuroblast divisions in *Drosophila* mushroom bodies. **Developmental Biology**, San Diego, v. 280, n. 1, p. 177-186, 2005.

PARKER, M.H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 4, n. 7, p. 497-507, 2003.

PARKYN, G.; MOOTOOSAMY, R.C.; CHENG, L.; THORPE, C.; DIETRICH, S. Hypaxial muscle development. **Results and Problems in Cell Differentiation**, Berlin, v. 38, p. 127-141, 2002.

PATERSON, A.H.; DEVERNA, J.W.; LANINI, B.; TANKSLEY, S.D. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. **Genetics**, Austin, v. 124, n. 3, p. 735-742, 1990.

PENG, W.T.; ROBINSON, M.D.; MNAIMNEH, S.; KROGAN, N.J.; CAGNEY, G.; MORRIS, Q.; DAVIERWALA, A.P.; GRIGULL, J.; YANG, X.; ZHANG, W.; MITSAKAKIS, N.; RYAN, O.W.; DATTA, N.; JOJIC, V.; PAL, C.; CANADIEN, V.; RICHARDS, D.; BEATTIE, B.; WU, L.F.; ALTSCHULER, S.J.; ROWEIS, S.; FREY, B.J.; EMILI, A.; GREENBLATT, J.F.; HUGHES, T.R. A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. **Cell**, Cambridge, v. 113, n. 7, p. 919-933, 2003.

PETIT, M.M.; SCHOENMAKERS, E.F.; HUYSMANS, C.; GEURTS, J.M.; MANDAHL, N.; VAN DE VEN, W.J. LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. **Genomics**, San Diego, v. 57, n. 3, p. 438-441, 1999.

PHAN, D.; RASMUSSEN, T.L.; NAKAGAWA, O.; MCANALLY, J.; GOTTLIEB, P.D.; TUCKER, P.W.; RICHARDSON, J.A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. **Development**, Cambridge, v. 132, n. 11, p. 2669-2678, 2005.

POTTS, J.K.; ECHTERNKAMP, S.E.; SMITH, T.P.L.; REECY, J.M. Characterization of gene expression in double-muscled and normal-muscled bovine embryos. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 438-444, 2003.

POURQUIE, O. Notch around the clock. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 9, n. 5, p. 559-565, 1999.

POURQUIE, O. Vertebrate somitogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 311-350, 2001.

POURQUIE, O.; FAN, C.M.; COLTEY, M.; HIRSINGER, E.; WATANABE, Y.; BREANT, C.; FRANCIS-WEST, P.; BRICKELL, P.; TESSIER-LAVIGNE, M.; LE DOUARIN, N.M. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. **Cell**, Cambridge, v. 84, n. 3, p. 461-471, 1996.

PRIMER3. **Primer3 Input**. Chevy Chase, 2001. Disponível em:
<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi>. Acesso em: 03 jul. 2006.

PURHONEN, P.; LUNDBACK, A.K.; LEMONNIER, R.; LEBLANC, G.; HEBERT, H. Three-dimensional structure of the sugar symporter melibiose permease from cryo-electron microscopy. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 152, n. 1, p. 76-83, 2005.

PURI, P.L.; SARTORELLI, V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 185, n. 2, p. 155-173, 2000.

QUACKENBUSH, J. Computational analysis of microarray data. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 2, n. 6, p. 418-427, 2001.

QUENTIEN, M.H.; MANFROID, I.; MONCET, D.; GUNZ, G.; MULLER, M.; GRINO, M.; ENJALBERT, A.; PELLEGRINI, I. Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 46, p. 44408-44416, 2002.

RAJAGOPALAN, S.; DEITINGHOFF, L.; DAVIS, D.; CONRAD, S.; SKUTELLA, T.; CHEDOTAL, A.; MUELLER, B.K.; STRITTMATTER, S.M. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. **Nature Cell Biology**, London, v. 6, n. 8, p. 756-762, 2004.

REMIGNON, H.; GARDAHAUT, M.F.; MARCHE, G.; RICARD, F.H. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Dordrecht, v. 16, n. 2, p. 95-102, 1995.

RINTALA-MAKI, N.D.; SUTHERLAND, L.C. LUCA-15/RBM5, a putative tumour suppressor, enhances multiple receptor-initiated death signals. **Apoptosis**, London, v. 9, n. 4, p. 475-484, 2004.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, A.; NIEMELA, O.; PARKKILA, S. Hepatic and extrahepatic expression of the new iron regulatory protein hemojuvelin. **Haematologica**, Basel, v. 89, n. 12, p. 1441-1445, 2004.

ROME, S.; CLEMENT, K.; RABASA-LHORET, R.; LOIZON, E.; POITOU, C.; BARSH, G.S.; RIOU, J.P.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 20, p. 18063-18068, 2003.

RUDNICKI, M.A.; SCHNEGELSBERG, P.N.; STEAD, R.H.; BRAUN, T.; ARNOLD, H.H.; JAENISCH, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 7, p. 1351-1359, 1993.

RUY, D.C. **Mapeamento de QTL para desempenho e características de carcaça, nos cromossomos 3 e 5 de *Gallus gallus***. 2004. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SAITOH, F.; TIAN, Q.B.; OKANO, A.; SAKAGAMI, H.; KONDO, H.; SUZUKI, T. NIDD, a novel DHHC-containing protein, targets neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to the synaptic membrane through a PDZ-dependent interaction and regulates nNOS activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 28, p. 29461-29468, 2004.

SAMAD, T.A.; REBBAPRAGADA, A.; BELL, E.; ZHANG, Y.; SIDIS, Y.; JEONG, S.J.; CAMPAGNA, J.A.; PERUSINI, S.; FABRIZIO, D.A.; SCHNEYER, A.L.; LIN, H.Y.; BRIVANLOU, A.H.; ATTISANO, L.; WOOLF, C.J. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 14, p. 14122-14129, 2005.

SAMAD, T.A.; SRINIVASAN, A.; KARCHEWSKI, L.A.; JEONG, S.J.; CAMPAGNA, J.A.; JI, R.R.; FABRIZIO, D.A.; ZHANG, Y.; LIN, H.Y.; BELL, E.; WOOLF, C.J. DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 8, p. 2027-2036, 2004.

SANNA, B.; BUENO, O.F.; DAI, Y.S.; WILKINS, B.J.; MOLKENTIN, J.D. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 25, n. 3, p. 865-878, 2005.

SAS INSTITUTE INC. **SAS OnlineDOC®**. Disponível em:

<<http://www.id.unish.ch/software/unix/statmath/sas/sasdoc/stat/index.htm>> Acesso em: 03 jul. 2006.

SCAAL, M.; GROS, J.; LESBROS, C.; MARCELLE, C. *In ovo* eletroporation of avian somites. **Developmental Dynamics**, New York, v. 229, n. 3, p. 643-650, 2004.

SCHUEERMANN, G.N. Alteração na quantidade e qualidade da carne de aves através da manipulação das fibras musculares. In: APINCO. CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2004. Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. p. 165-178.

SCHUEERMANN, G.N.; BILGILI, S.F.; TUZUN, S.; MULVANEY, D.R. Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 8, p. 1404-1412, 2004.

SCHMIDT, C.; CHRIST, B.; MADEN, M.; BRAND-SABERI, B.; PATEL, K. Regulation of Epha4 expression in paraxial and lateral plate mesoderm by ectoderm-derived signals. **Developmental Dynamics**, New York, v. 220, n. 4, p. 377-386, 2001.

SCHMIDT, M.; TANAKA, M.; MUNSTERBERG, A. Expression of (beta)-catenin in the developing chick myotome is regulated by myogenic signals. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 19, p. 4105-4113, 2000.

SCHMIDTMER, J.; ENGELKAMP, D. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 105-110, 2004.

SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J. Fowl Squence. **Nature**, London, v. 432, p. 679-680, 2004.

SCHNEIDER, J.W.; W, GU; L. ZHU; V. MAHDAVI; NADAL-GINARD, B. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb muscle cells. **Science**, Washington, v. 264, n. 5164, p. 1467-1471. 1994.

SENJU, S.; NISHIMURA, Y. Identification of human and mouse GP-1, a putative member of a novel G-protein family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 231, n. 2, p. 360-364, 1997.

SEWALEM, A.; MORRICE, D.M.; LAW, A.; WINDSOR, D.; HALEY, C.S.; IKEOBI, C.O.N.; BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Mapping quantitative trait loci for body weight at three, six and nine weeks of age in a broiler layer cross. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 1775-1781, 2002.

SHARMA, K.; LEONARD, A.E.; LETTIERI, K.; PFAFF, S.L. Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding. **Nature**, London, v. 406, n. 6795, p. 515-519, 2000.

SHIMKETS, R.A.; LOWE, D.G.; TAI, J.T.; SEHL, P.; JIN, H.; YANG, R.; PREDKI, P.F.; ROTHBERG, B.E.; MURTHA, M.T.; ROTH, M.E.; SHENOY, S.G.; WINDEMUTH, A.; SIMPSON, J.W.; SIMONS, J.F.; DALEY, M.P.; GOLD, S.A.; MCKENNA, M.P.; HILLAN, K.; WENT, G.T.; ROTHBERG, J.M. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, n. 8, p. 798-803, 1999.

SHIRASAKI, R.; PFAFF, S.L. Transcriptional codes and the control of neuronal identity. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 25, p. 251-281, 2002.

SILVA, M.A.N. **Interação genótipo-ambiente e análise da variabilidade no melhoramento genético de linhagens de avós de frangos de corte**. 2006. 82 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SIWEK, M.; CORNELISSEN, S.J.; BUITENHUIS, A.J.; NIEUWLAND, M.G.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, R.P.; GROENEN, M.A.; PARMENTIER, H.K.; VAN DER POEL, J.J. Quantitative trait loci for body weight in layers differ from quantitative trait loci specific for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 853-859, 2004.

SMITH, J.; SPEED, D.; HOCKING, P.M.; TALBOT, R.T.; DEGEN, W.G.; SCHIJNS, V.E.; GLASS, E.J.; BURT, D.W. Development of a chicken 5 K microarray targeted towards immune function. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 49-59, 2006.

SOUZA, C.A. **Investigação de polimorfismos nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em *Gallus gallus***. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SOUZA, E.M. Melhoramento do frango de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. **Anais ...** Viçosa: SBZ, 2000. p. 1-8.

SOUZA, E.M.; MICHELAN FILHO, T. Genética avícola. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. (Ed). **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. cap. 2, p. 23-35.

SPILIOTIS, E.T.; KINOSHITA, M.; NELSON, W.J. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. **Science**, Washington, v. 307, n. 5716, p. 1781-1785, 2005.

STICKNEY, H.L.; BARRESI, M.J.; DEVOTO, S.H. Somite development in zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 219, n. 3, p. 287-303, 2000.

STOCKDALE, F.E. Mechanisms of formation of muscle fiber types. **Cell Structure and Function**, Okayama, v. 22, n. 1, p. 37-43, 1997.

STROMER, T.; EHRNSPERGER, M.; GAESTEL, M.; BUCHNER J. Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 20, p. 18015-18021, 2003.

SU, A.I.; COOKE, M.P.; CHING, K.A.; HAKAK, Y.; WALKER, J.R.; WILTSHIRE, T.; ORTH, A.P.; VEGA, R.G.; SAPINOSO, L.M.; MOQRICH, A.; PATAPOUTIAN, A.; HAMPTON, G.M.; SCHULTZ, P.G.; HOGENESCH, J.B. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 7, p. 4465-4470, 2002.

SUTCLIFFE, J.G.; FOYE, P.E.; ERLANDER, M.G.; HILBUSH, B.S.; BODZIN, L.J.; DURHAM, J.T.; HASEL, K.W. TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 5, p. 1976-1981, 2000.

SUZUKI, T.; NISHIYAMA, K.; YAMAMOTO, A.; INAZAWA, J.; IWAKI, T.; YAMADA, T.; KANAZAWA, I.; SAKAKI, Y. Molecular cloning of a novel apoptosis-related gene, human Nap1 (NCKAP1), and its possible relation to Alzheimer disease. **Genomics**, San Diego, v. 63, n. 2, p. 246-254, 2000.

SWARTZ, M.E.; EBERHART, J.; PASQUALE, E.B.; KRULL, C.E. EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 23, p. 4669-4680, 2001.

TAJBAKSH, S.; BOBER, E.; BABINET, C.; POURNIN, S.; ARNOLD, H.H.; BUCKINGHAM, M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. **Developmental Dynamics**, New York, v. 206, n. 3, p. 291-300, 1996.

TAKESHITA, S.; KIKUNO, R.; TEZUKA, K.; AMANN, E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. **The Biochemical Journal**, London, v. 294, p. 271-278, 1993.

TANNAHILL, D.; BRITTO, J.M.; VERMEREN, M.M.; OHTA, K.; COOK, G.M.; KEYNES, R.J. Orienting axon growth: spinal nerve segmentation and surround-repulsion. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 44, n. 1, p. 119-127, 2000.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TAVAZOIE, S.; HUGHES, J.D.; CAMPBELL, M.J.; CHO, R.J.; CHURCH, G.M. Systematic determination of genetic network architecture. **Nature Genetics**, London, v. 22, n. 3, p. 281-285, 1999.

TESSERAUD, S.; CHAGNEAU, A.M.; GRIZARD, J. Muscle protein turnover during early development in chickens divergently selected for growth rate. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 10, p. 1465-1471, 2000.

TESSIER-LAVIGNE, M.; GOODMAN, C.S. The molecular biology of axon guidance. **Science**, Washington, v. 274, n. 5290, p. 1123-1133, 1996.

TIGR. THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH. Disponível em: < <http://www.tigr.org/>>
Acesso em: 03 jul. 2006.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 51, p. 40235-40243, 2000.

THORNTON, C.; SNOWDEN, M.A.; CARLING, D. Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 20, p. 12443-12450, 1998.

TISO, N.; MAJETTI, M.; STANCHI, F.; RAMPAZZO, A.; ZIMBELLO, R.; NAVA, A.; DANIELI, G.A. Fine mapping and genomic structure of ACTN2, the human gene coding for the sarcomeric isoform of alpha-actinin-2, expressed in skeletal and cardiac muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 265, n. 1, p. 256-259, 1999.

TONG, J.J.; LIU, J.; BERTOS, N.R.; YANG, X.J. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 1114-11123, 2002.

TOSNEY, K. Proximal tissues and patterned neurite outgrowth at the lumbosacral level of the chick embryo: Deletion of the dermamyotome. **Developmental Biology**, San Diego, v. 122, n. 2, p. 540-558, 1987.

TOSNEY, K.W. Proximal tissues and patterned neurite outgrowth at the lumbosacral level of the chick embryo: partial and complete deletion of the somite. **Developmental Biology**, San Diego, v. 127, n. 2, p. 266-286, 1988.

TREMBLAY, P.; DIETRICH, S.; MERICKSKAY, M.; SCHUBERT, F.R.; ZHENLIN, L.; PAULIN, D. A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. **Developmental Biology**, San Diego, v. 203, n. 1, p. 49-61, 1998.

TUISKULA-HAAVISTO, M.; HONKATUKIA, M.; VILKKI, J.; DE KONING, D.J.; SCHULMAN, N.F.; MAKI-TANILA, A. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, n. 7, p. 919-927, 2002.

UGI, S.; IMAMURA, T.; MAEGAWA, H.; EGAWA, K.; YOSHIKAWA, T.; SHI, K.; OBATA, T.; EBINA, Y.; KASHIWAGI, A.; OLEFSKY, J.M. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 19, p. 8778-8789, 2004.

UMEHARA, H.; NISHII, Y.; MORISHIMA, M.; KAKEHI, Y.; KIOKA, N.; AMACHI, T.; KOIZUMI, J.; HAGIWARA, M.; UEDA, K. Effect of cisplatin treatment on speckled distribution of a serine/arginine-rich nuclear protein CROP/Luc7A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 301, n. 2, p. 324-329, 2003.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 113-122, 2006.

VAN LAERE, A.S.; NGUYEN, M.; BRAUNSCHEWIG, M.; NEZER, C.; COLLETTE, C.; MOREAU, L.; ARCHIBALD, A.L.; HALEY, C.S.; BUYS, N.; TALLY, M.; ANDERSSON, G.; GEORGES, M.; ANDERSSON, L. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature**, London, v. 425, n. 6960, p.832-836, 2003.

VAN VALKENBURGH, H.; SHERN, J.F.; SHARER, J.D.; ZHU, X.; KAHN, R.A. ADP-ribosylation factors (ARFs) and ARF-like 1 (ARL1) have both specific and shared effectors: characterizing ARL1-binding proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 25, p. 22826-22837, 2001.

VELEZ, .C.; ARANEGA, A.E.; MARCHAL, J.A.; PRADOS, J.; MELGUIZO, C.; CARRILLO, E.; BOULAIZ, H.; MADEDDU, R.; SANCHEZ-MONTESINOS, I.; ARANEGA, A. Contractile regulatory proteins tropomyosin and troponin-T as indicators of the modulatory role of retinoic acid. **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 175, n. 1, p. 25-33, 2003.

VIELMETTER, J.; KAYYEM, J.F.; ROMAN, J.M.; DREYER, W.J. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 127, n. 6, p. 2009-2020, 1994.

VIGUERIE, N.; CLEMENT, K.; BARBE, P.; COURTINE, M.; BENIS, A.; LARROUY, D.; HANCZAR, B.; PELLOUX, V.; POITOU, C.; KHALFALLAH, Y.; BARSH, G.S.; THALAMAS, C.; ZUCKER, J.D.; LANGIN, D. In vivo epinephrine-mediated regulation of gene expression in human skeletal muscle. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v. 89, n. 5, p. 2000-2014, 2004.

WANG, J.; DAI, H.; YOUSAF, N.; MOUSSAIF, M.; DENG, Y.; BOUFELLIGA, A.; SWAMY, O.R.; LEONE, M.E.; RIEDEL, H. Grb10, a positive, stimulatory signaling adapter in platelet-derived growth factor BB-, insulin-like growth factor I-, and insulin-mediated mitogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, n. 9, p. 6217-6228, 1999.

WANG, R.L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, London, v. 398, n. 6724, p. 236-239, 1999.

WEHNER, M.; KILIMANN, M.W. Human cDNA encoding the muscle isoform of the phosphorylase kinase gamma subunit (PHKG1). **Human Genetics**, New York, v. 96, n. 5, p. 616-618, 1995.

WEI, Q.; PATERSON, B.M. Regulation of MyoD function in the dividing myoblast. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 490, n. 3, p. 171-178, 2001.

WIEDEMEYER, R.; WESTERMANN, F.; WITTKE, I.; NOWOCK, J.; SCHWAB, M. Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 3, p. 401-411, 2003.

WILLIAMS, B.A.; ORDAHL, C.P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. **Development**, Cambridge, v. 120, n. 4, p. 785-796, 1994.

WINSTON, J.T.; KOEPP, D.M.; ZHU, C.; ELLEDGE, S.J.; HARPER, J.W. A family of mammalian F-box proteins. **Current Biology**, London, v. 9, n. 20, p. 1180-1182, 1999.

WITTMANN, T.; WILM, M.; KARSENTI, E.; VERNOS, I. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 149, n. 7, p. 1405-1418, 2000.

WOLFINGER, R.D.; GIBSON, G.; WOLFINGER, E.D.; BENNET, L; HAMADEH, H.; BUSHEL, P. AFSHARI, C.; PAULES, R.S. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models, **Journal of Computational Biology**, New York, v. 8, n. 6, p. 625-637, 2001.

WONG, G.K.; LIU, B.; WANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Z.; MENG, Q.; ZHOU, J.; LI, D.; ZHANG, J.; NI, P.; LI, S.; RAN, L.; LI, H.; ZHANG, J.; LI, R.; LI, S.; ZHENG, H.; LIN, W.; LI, G.; WANG, X.; ZHAO, W.; LI, J.; YE, C.; DAI, M.; RUAN, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; HE, X.; ZHANG, Y.; WANG, J.; HUANG, X.; TONG, W.; CHEN, J.; YE, J.; CHEN, C.; WEI, N.; LI, G.; DONG, L.; LAN, F.; SUN, Y.; ZHANG, Z.; YANG, Z.; YU, Y.; HUANG, Y.; HE, D.; XI, Y.; WEI, D.; QI, Q.; LI, W.; SHI, J.; WANG, M.; XIE, F.; WANG, J.; ZHANG, X.; WANG, P.; ZHAO, Y.; LI, N.; YANG, N.; DONG, W.; HU, S.; ZENG, C.; ZHENG, W.; HAO, B.; HILLIER, L.W.; YANG, S.P.; WARREN, W.C.; WILSON, R.K.; BRANDSTROM, M.; ELLEGREN, H.; CROOIJMANS, R.P.; VAN DER POEL, J.J.; BOVENHUIS, H.; GROENEN, M.A.; OVCHARENKO, I.; GORDON, L.; STUBBS, L.; LUCAS, S.; GLAVINA, T.; AERTS, A.; KAISER, P.; ROTHWELL, L.; YOUNG, J.R.; ROGERS, S.; WALKER, B.A.; VAN HATEREN, A.; KAUFMAN, J.; BUMSTEAD, N.; LAMONT, S.J.; ZHOU, H.; HOCKING, P.M.; MORRICE, D.; DE KONING, D.J.; LAW, A.; BARTLEY, N.; BURT, D.W.; HUNT, H.; CHENG, H.H.; GUNNARSSON, U.; WAHLBERG, P.; ANDERSSON, L.; KINDLUND, E.; TAMMI, M.T.; ANDERSSON, B.; WEBBER, C.; PONTING, C.P.; OVERTON, I.M.; BOARDMAN, P.E.; TANG, H.; HUBBARD, S.J.; WILSON, S.A.; YU, J.; WANG, J.; YANG, H.; INTERNATIONAL CHICKEN POLYMORPHISM MAP CONSORTIUM. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. **Nature**, London, v. 432, n. 7018, p. 717-722, 2004.

WU, L.F.; HUGHES, T.R.; DAVIERWALA, A.P.; ROBINSON, M.D.; STOUGHTON, R.; ALTSCHULER, S.J. Large-scale prediction of *Saccharomyces cerevisiae* gene function using overlapping transcriptional clusters. **Nature Genetics**, London, v. 31, n. 3, p. 255-265, 2002.

YAEKURA, K.; JULYAN, R.; WICKSTEED, B.L.; HAYS, L.B.; ALARCON, C.; SOMMERS, S.; POITOUT, V.; BASKIN, D.G.; WANG, Y.; PHILIPSON, L.H.; RHODES, C.J. Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 11, p. 9715-9721, 2003.

YASUDA, M.; KOSHIDA, S.; SATO, N.; OBINATA, T. Complete primary structure of chicken cardiac C-protein (MyBP-C) and its expression in developing striated muscles. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 27, n. 10, p. 2275-2286, 1995.

YONASH, N.; BACON, L.D.; WITTER, R.L.; CHENG, H.H. High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. **Animal Genetics**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 126-135, 1999.

ZHANG, M.; McLENNAN I.S. Primary myotubes preferentially mature into either the fastest or slowest muscle fibers. **Developmental Dynamics**, New York, v. 213, n. 1, p. 147-157, 1998.

ZHANG, W.; MORRIS, Q.D.; CHANG, R.; SHAI, O.; BAKOWSKI, M.A.; MITSAKAKIS, N.; MOHAMMAD, N.; ROBINSON, M.D.; ZIRNGIBL, R.; SOMOGYI, E.; LAURIN, N.; EFTEKHARPOUR, E.; SAT, E.; GRIGULL, J.; PAN, Q.; PENG, W.T.; KROGAN, N.; GREENBLATT, J.; FEHLINGS, M.; VAN DER KOOY, D.; AUBIN, J.; BRUNEAU, B.G.; ROSSANT, J.; BLENCOWE, B.J.; FREY, B.J.; HUGHES, T.R. The functional landscape of mouse gene expression. **Journal of Biology**, London, v. 3, n. 5, p. 21-42, 2004.

ZHOU, H.; LI, H.; LAMONT, S.J. Genetic markers associated with antibody response kinetics in adult chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 5, p. 699-708, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)