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

**Identificação e análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs)
na hipófise e hipotálamo de *Gallus gallus***

Clarissa Sanches da Silva Cassoli

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

Piracicaba

2007

Clarissa Sanches da Silva Cassoli

Bióloga

**Identificação e análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs)
na hipófise e hipotálamo de *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

2007

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

Cassoli, Clarissa Sanches da Silva

Identificação e análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) na hipófise e hipotálamo de *Gallus gallus* / Clarissa Sanches da Silva Cassoli. - - Piracicaba, 2007.

128 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Expressão gênica 2. Frango de corte 3. Genomas 4. Hipófise
5. Hipotálamo 6. Sequenciamento I. Título

CDD 636.513

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me concedido esta grande oportunidade de aprendizado e crescimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, por ter me aceito no programa, por ter me confiado este projeto e, principalmente, por ter tornado possível que eu vivenciasse todas estas experiências.

Agradeço a CAPES, a FAPESP e a Embrapa – Suínos e Aves pela bolsa de estudos e financiamento do projeto.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal pelos bons momentos de convivência, em especial a Písgui e a Carlota, que se tornaram muito mais do que minhas amigas.

Agradeço a grande ajuda da Érika Jorge, a paciência da Carla Barsalobres e ao companheirismo da Daniele Takahashi.

Agradeço aos professores que se dispuseram a me passar um pouquinho do conhecimento que adquiriram durante anos de dedicação.

Agradeço aos meus pais Maura e Francisco e ao meu irmão Gustavo, por terem me apoiado.

Agradeço ao meu grande amor Laerte, por ter entrado na minha vida nesta fase, tornando-a mais leve e colorida e ao nosso filho Filipe, por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Genômica funcional	16
2.2 Genômica funcional de aves	18
2.3 Desenvolvimento e crescimento das aves	22
2.3.1 Crescimento animal	22
2.3.2 Fatores hormonais que atuam sobre os processos fisiológicos	23
2.3.3 Importância da hipófise e hipotálamo para o crescimento animal	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Linhagens utilizadas	30
3.2 Obtenção dos ovos e criação das aves	31
3.3 Coleta da hipófise e hipotálamo das aves e extração do RNA total	32
3.4 Isolamento do RNA mensageiro (mRNA)	34
3.5 Construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA)	34
3.5.1 Síntese da primeira e segunda fita de cDNA	35
3.5.2 Adição do adaptador <i>SalI</i>	36
3.5.3 Digestão com <i>NotI</i>	37
3.5.4 Coluna cromatográfica	37
3.5.5 Ligação do cDNA ao vetor pSPORT 1	38
3.5.6 Transformação por eletroporação em célula competente EletroMAX™ DH10B™	39
3.6 Mini-preparação do DNA plasmidial	39
3.7 PCR da Mini-preparação plasmidial	40
3.8 Reação de seqüenciamento	41

3.9 Purificação e aplicação da reação de seqüenciamento	42
3.10 Análise das seqüências das ESTs obtidas	42
3.10.1 Análise de qualidade e agrupamento das seqüências	42
3.10.2 Identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) linhagem específicos	43
3.10.3 Identidade das ESTs	43
3.10.4 Classificação das ESTs de acordo com as categorias do <i>Gene Ontology</i> (GO)	44
3.10.5 Padrão de expressão digital (<i>digital expression profile</i>)	44
3.11 Obtenção das sondas e impressão das membranas	45
3.11.1 Escolha dos clones a serem impressos	45
3.11.2 Replicação dos clones utilizados para a construção das sondas	49
3.11.3 Mini-preparação plasmidial dos clones	49
3.11.4 Seqüenciamento dos clones	50
3.11.5 PCR da mini-prep dos clones	50
3.11.6 Precipitação do produto de PCR	51
3.11.7 Preparo da solução de impressão	51
3.11.8 Impressão das membranas	51
3.12 Síntese e hibridização das membranas com a sonda plasmidial (Overgo)	52
3.12.1 Síntese do <i>primer</i> Overgo	52
3.12.2 Reação de síntese da sonda plasmidial	53
3.12.3 Hibridização das membranas com a sonda plasmidial	54
3.12.4 Exposição das membranas e revelação do IP	55
3.12.5 Lavagem final das membranas (<i>Stripping</i>)	55
3.13 Preparo dos alvos	56
3.13.1 Coleta dos tecidos e extração de RNA total	56
3.13.2 Construção dos alvos	56
3.13.3 Hibridização das membranas com os alvos	57
3.13.4 Exposição das membranas e revelação do IP	57
3.13.5 Lavagem final das membranas (<i>Stripping</i>)	57
3.14 Quantificação da expressão dos genes e análise estatística	58

3.14.1	Quantificação e normalização do sinal dos <i>spots</i>	58
3.14.2	Análise estatística	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Extração de RNA total e isolamento do mRNA	60
4.2	Construção das bibliotecas de cDNA	61
4.3	Mini-preparação plasmidial	62
4.4	PCR da mini-preparação do DNA plasmidial	63
4.5	Seqüenciamento, análise de qualidade e montagem das seqüências da biblioteca HC1 e HT1	65
4.6	Análise da identidade das ESTs	68
4.7	Caracterização das ESTs	70
4.8	Padrão de expressão digital (<i>digital expression profile</i>)	74
4.9	Identificação de SNPs (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)	88
4.10	Obtenção das sondas e impressão das membranas	95
4.10.1	Produtos de PCR da mini-preparação plasmidial dos clones selecionados para o estudo de expressão gênica	95
4.10.2	Impressão dos produtos de PCR e hibridização com a sonda plasmidial OVERGO	95
4.10.3	Extração do RNA total dos cinco tecidos para construção dos alvos	97
4.10.4	Hibridizações das membranas com os alvos	97
4.10.5	Análise estatística – Genes diferencialmente expressos	100
4.10.5.1	Quantificação e normalização dos sinais dos <i>spots</i>	100
4.10.5.2	Análise estatística	102
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
	REFERÊNCIAS	114

RESUMO

Identificação e análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) na hipófise e hipotálamo de *Gallus gallus*

A avicultura brasileira tem alcançado altos índices de desempenho na produção de carne e ovos, como resultado da atualização constante de tecnologias no setor. A biotecnologia vem contribuindo nesse sentido, atuando especialmente em programas de seleção de animais com maior potencial de desenvolvimento e crescimento. Como toda a fisiologia animal é controlada direta e/ou indiretamente pela hipófise e hipotálamo, este trabalho propôs identificar e analisar genes expressos nestas estruturas de galinhas de duas linhagens divergentes quanto ao potencial de crescimento e avaliar a expressão dos genes correspondentes a transcritos cuja identidade não pôde ser revelada (sem similar nos bancos de dados), uma vez que estes podem representar possíveis genes novos. Para isto, foram construídas e analisadas bibliotecas a partir da hipófise e hipotálamo de aves de 21 dias de idade de uma linha macho de corte (TT) e uma linhagem de postura (CC), provenientes da Embrapa Suínos e Aves. Um total de 4.286 ESTs válidas foi obtido (no mínimo 150 pb com qualidade PHRED acima de 20), correspondendo a 2.133 ESTs da biblioteca da linhagem TT e 2.153 ESTs da biblioteca da linhagem CC. O exercício de montagem, via programa Cap3, revelou 3.074 seqüências únicas, sendo 1.643 da biblioteca da linhagem TT e 1.649 da CC. Estas seqüências únicas foram automaticamente classificadas, de acordo com as categorias do *GeneOntology*, sendo que as seqüências de ambas as bibliotecas apresentaram uma distribuição similar entre os termos. Após montagem das ESTs e análise do padrão de expressão digital das seqüências constituintes, dos 389 *contigs* obtidos, 194 foram compostos por seqüências diferencialmente expressas entre as bibliotecas. Foram detectados 28 *contigs* contendo SNPs linhagem específicos, sendo 52 SNPs TT específicos e 25 CC específicos. Um total de 146 ESTs não pôde ter sua identidade revelada, porém destas, 133 puderam ser localizadas no genoma da galinha e apresentaram pelo menos uma fase de leitura aberta (ORF). Após análise de expressão gênica, os genes correspondentes a 78 destas ESTs sem identidade apresentaram-se diferencialmente expressos entre pelo menos dois dos tecidos de aves de uma linhagem comercial de corte de 21 dias de idade estudados: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo. Os resultados apresentados são promissores e merecem ser investigados em estudos futuros com o objetivo de identificar marcadores moleculares para programas de seleção e melhoramento animal.

Palavras-chave: Hipófise; Hipotálamo; *Gallus gallus*; ESTs; Expressão gênica

ABSTRACT

Identification and characterization of expressed sequence tags (ESTs) in pituitary and hypothalamus in *Gallus gallus*

The Brazilian aviculture has reached a high development level in both meat and egg production as a result of constant technological actualization in the sector. Biotechnology can contribute in this way acting in selection programs of animals that show higher growth and development potential. The global animal physiology is direct or indirectly controlled by pituitary and hypothalamus. The aim of this work was to identify and analyse genes expressed in these structures of two divergent line chickens according to growth potential and evaluate the gene expression of corresponding transcripts classified as “no hit”, once these ESTs could represent new genes. In this way, two pituitary and hypothalamus libraries of 21 days broiler (TT) and a layer (CC) chickens supplied by Embrapa Swine and Poultry National Research Center were constructed and analysed. A total of 4,286 valid ESTs was obtained (showing at least 150 bp with PHRED quality above 20) corresponding to 2,133 ESTs of TT line library and 2,153 ESTs of CC line library. The clustering process by Cap3 resulted in 3,074 unique sequences corresponding to 1,643 TT library sequences and 1,649 of CC sequences. These unique sequences were automatically annotated according GeneOntology categories and both library sequences showed a similar distribution between the terms. After ESTs clustering and northern digital analysis, 389 contigs were obtained – 194 of them showed differentially expressed sequences between the libraries. A total of 28 contigs showed line specific SNPs, corresponding to 52 TT specific SNPs and 25 CC specific SNPs. 146 ESTs were classified as “no hit” but 133 of these sequences were localized in chicken genome and showed open reading frame (ORF). After gene expression analysis, the genes of 78 “no hit” ESTs showed different expression level between the five tissues of commercial broilers with 21 days old: pituitary, hypothalamus, brain, liver and muscle. These results are promising and must be more investigated in future studies to identify molecular markers for use in animal selection and improvement programs.

Keywords: Pituitary; Hypothalamus; *Gallus gallus*; ESTs; Gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da sinalização intracelular promovida pela ligação do GH ao seu receptor	26
Figura 2 - Vias de sinalização promovidas pela ligação do IGF-I ao seu receptor	29
Figura 3 - Fotografia de duas aves, uma da linhagem TT e outra da linhagem CC, aos 21 dias de idade	31
Figura 4 - Fotografias do procedimento de coleta da hipófise e hipotálamo	33
Figura 5 - Esquema ressaltativo da clonagem direcionada	36
Figura 6 - Disposição dos clones referentes às bibliotecas HC1 e HT1 e dos controles, GAPDH e β -actina, nas duas placas de 96	49
Figura 7 - Representação da impressão das membranas (pontos pretos referem-se ao gene controle GAPDH e pontos cinzas ao gene controle β -actina)	52
Figura 8 - Regiões, do pSPORT1, de inserção dos produtos de PCR e de anelamento dos <i>primers</i> , utilizadas para construção do <i>primer</i> Overgo	53
Figura 9 - Fotografia do gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total extraído da hipófise e hipotálamo das aves CC (primeira fileira) e TT (segunda fileira). Cada canaleta contém 1 μ L do RNA total extraído e 3 μ L de bromofenol, corados com brometo de etídio	60
Figura 10 - Fotografias dos géis de agarose 1% para verificação da qualidade do mRNA isolado a partir da população de RNA total, extraída da hipófise e hipotálamo das aves das linhagens CC (A) e TT (B)	61
Figura 11 - Revelação das membranas para verificação da distribuição do tamanho dos fragmentos de cDNA entre os tubos da biblioteca HC1 (A) e HT1 (B). Foram utilizadas para ligação e transformação, as amostras contidas nos tubos 7 e 8 da biblioteca HC1 e 7, 8 e 9 da HT1	62
Figura 12 - Fotografia do gel de agarose 1% para verificação da qualidade e estimativa da concentração do DNA plasmidial extraído das bibliotecas HC1 e HT1, em relação ao padrão de peso molecular pGEM4Z (40 ng/ μ L)	63

Figura 13 - Fotografia do gel de agarose 1%, para verificação do tamanho dos produtos de PCR da mini-prep da biblioteca HC1. As canaletas 1 e 26 correspondem ao marcador molecular 1 kb DNA <i>Ladder</i> (GIBCO/BRL)	64
Figura 14 - Fotografia do gel de agarose 1%, para verificação do tamanho dos produtos de PCR da mini-prep da biblioteca HT1. As canaletas 1 e 26 correspondem ao marcador molecular 1 kb DNA <i>Ladder</i> (GIBCO/BRL)	64
Figura 15 - Relação entre frequência e número de seqüências constituintes dos <i>clusters</i> da biblioteca HT1	66
Figura 16 - Relação entre frequência e número de seqüências constituintes dos <i>clusters</i> da biblioteca HC1	67
Figura 17 - Relação entre frequência e número de seqüências constituintes dos <i>clusters</i> resultantes da montagem conjunta das seqüências das bibliotecas HC1 e HT1	68
Figura 18 - Número de alinhamento (BlastN) das 133 ESTs sem identidade no cromossomos que compreendem o genoma da galinha	69
Figura 19 - Distribuição das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 dentro dos termos da ontologia componente celular	72
Figura 20 - Distribuição das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 dentro dos termos da ontologia processo biológico	73
Figura 21 - Distribuição das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 dentro dos termos da ontologia Função Molecular	73
Figura 22 - Distribuição dos SNPs CC e TT específicos entre os 28 <i>contigs</i>	89
Figura 23 - Distribuição das 593 ESTs (das bibliotecas HC1 e HT1) entre os 28 <i>contigs</i> apresentando SNPs	94
Figura 24 - Eletroforese dos produtos de PCR das mini-prep dos clones selecionados para análise de expressão	95
Figura 25 - Hibridização das membranas de número 13 (A), 14 (B), 16 (C), 18 (D), 19 (E) e 20 (F) com a sonda plasmidial OVERGO	96
Figura 26 - Foto do gel de agarose 1% do RNA total extraído dos cinco tecidos: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo, utilizados para a construção dos alvos empregados nas hibridizações	98

Figura 27 - Resultados obtidos após hibridização das membranas com os cinco alvos: hipófise (A), hipotálamo (B), cérebro (C), músculo (D) e fígado (E)	99
Figura 28 - Comportamento dos 144 genes estudados, bem como a relação destes com o GAPDH, nos cinco tecidos: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo	101
Figura 29 - Diferença na expressão dos 78 genes, comparando-se: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 – hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos pesos de ovos, peso corporal e peso do músculo peitoral de aves da linhagem CC e TT nas fases: embrionária e pós-eclosão (Alves, 2004)	30
Tabela 2 - Relação dos componentes de enriquecimento por kg de ração oferecida às aves	32
Tabela 3 - Relação dos níveis de garantia dos constituintes da ração oferecida	32
Tabela 4 - Relação das ESTs utilizadas para construção das sondas, bem como suas posições na placa de impressão e nas membranas	45
Tabela 5 - Resultados da análise individual e conjunta da qualidade das bases (<i>base calling</i>), montagem e mascaramento (<i>trimming</i>) das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1	65
Tabela 6 - Classificação das seqüências das bibliotecas HC1 e HT1 segundo os termos do GO	71
Tabela 7 - Relação dos <i>contigs</i> cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)	75
Tabela 8 - Relação dos <i>contigs</i> cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)	82
Tabela 9 - Relação dos SNPs linhagem específicos encontrados nos 28 contigs	90
Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo	103

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a avicultura brasileira alcançou altos índices de desempenho na produção de carne e ovos, como resultado da atualização constante de tecnologias no setor. Tais investimentos fizeram com que o Brasil alcançasse a posição de maior exportador de carne de frango em 2004, ultrapassando os Estados Unidos, que se mantinham neste posto por mais de uma década, embora, segundo o relatório anual da ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Carne de Frango) de 2004, o maior mercado brasileiro continue sendo o nacional (consumindo 71% da produção total de carne de frango).

As estratégias clássicas de seleção contribuíram com grande parte dos avanços observados na avicultura, sendo que linhagens selecionadas para corte apresentam um crescimento de três a quatro vezes mais rápido, em relação às aves ancestrais (*red jungle fowl*) - que não foram submetidas à seleção. Porém, há diversos traços fenotípicos difíceis de serem melhorados por meio da criação seletiva, e é nessas áreas que as tecnologias genômicas modernas podem apresentar grande impacto, são eles (BULFIELD, 2004):

- Traços difíceis e/ou caros de serem medidos, como composição e qualidade de carcaça, comportamento e bem estar;
- Traços que apresentam baixa herdabilidade, como reprodução e *fitness*;
- Resistência a doenças e resposta à vacinação.

Acompanhando os recentes progressos na área da genômica e utilizando-se das novas ferramentas e tecnologias do setor, o Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP vem conduzindo estudos com o objetivo de compreender os processos moleculares envolvidos no aumento de produção em aves. Para isto, estão sendo utilizadas metodologias que envolvem mapeamento genético e identificação e caracterização de genes. Para o mapeamento genético estão sendo efetuados cruzamentos de linhagens divergentes para crescimento e análises com marcadores microssatélites, enquanto que para a identificação de genes estão sendo empregadas as metodologias de construção de bibliotecas de cDNA, RT-PCR quantitativo e *macroarrays*, em tecidos embrionários precursores de musculatura esquelética (somitos associados ao tubo neural) e tecido muscular (membros anteriores e posteriores, musculatura peitoral) de aves jovens e embriões.

Entre as metodologias disponíveis para a identificação de genes, a análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) tem provado ser bastante informativa. Esta metodologia consiste no seqüenciamento parcial das extremidades dos clones obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA de determinado tecido e permite estabelecer o conjunto de genes expressos e o nível de atividade dos mesmos, possibilitando, desta forma, se fazer comparações entre diferentes tecidos ou espécies, além de possibilitar a identificação de polimorfismos em regiões de interesse do genoma (HATEY et al., 1998).

Porém, a caracterização da estrutura de um gene é apenas parte do processo que fornecerá indícios sobre o seu papel biológico. Atualmente, mais informações sobre a função dos genes podem ser obtidas identificando-se aqueles diferencialmente expressos em condições biológicas distintas, uma vez que diferenças na expressão de um gene podem ser quantificadas de acordo com os níveis de mRNA do mesmo (CALVET, 1991). Até pouco tempo atrás, as metodologias empregadas para este tipo de análise possibilitavam a avaliação de poucos genes ao mesmo tempo. Hoje, as metodologias mais eficientes para avaliação simultânea de um grande número de genes consistem na construção de arranjos de DNA em lâminas de vidro, os *microarrays* (KHAN et al., 1999), e em náilon, os *macroarrays* (LENNON; LEHRACH, 1991).

Está bem estabelecido que praticamente toda a fisiologia animal é controlada direta ou indiretamente pela hipófise e hipotálamo, porém os mecanismos genéticos que governam os processos de funcionamento e manutenção do metabolismo, crescimento somático e função reprodutiva em galinhas são amplamente desconhecidos (COGBURN et al., 2003). Sendo assim, a identificação de genes expressos nestas estruturas, além de preencher as lacunas existentes na compreensão das vias moleculares envolvidas, fornecerá ferramentas que poderão ser empregadas em futuros programas de melhoramento animal.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido no intuito de catalogar genes expressos na hipófise e hipotálamo de galinhas e identificar características distintas destes, possivelmente associadas à linhagem (resultado da seleção). Para isto, foram construídas duas bibliotecas de cDNA (uma biblioteca para cada linhagem) a partir da hipófise e hipotálamo de aves jovens (21 dias idade) de duas linhagens divergentes quanto ao potencial de crescimento: uma linha macho de corte (TT) e uma linhagem de postura (CC), provenientes da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC). Pelo fato desta metodologia (construção e seqüenciamento de bibliotecas de cDNA) possibilitar não só a catalogação e investigação do conjunto de genes

expressos em determinado tecido, mas também a identificação de genes novos, não disponíveis nos bancos de dados de informação genômica, o emprego desta técnica como complemento ao seqüenciamento do genoma da galinha é fundamental, pois estima-se que dos 20.000 a 23.000 genes presentes no genoma deste animal, somente 80 a 90% seja conhecido (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004). Com base nisto, numa segunda etapa deste trabalho, as ESTs que não puderam ter sua identidade revelada (*no hits*) foram empregadas na construção de membranas de náilon (*macroarrays*) e tiveram a expressão de seus genes correspondentes avaliada em cinco tecidos (hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo) de aves jovens (21 dias de idade) de uma linhagem comercial de frango de corte. Com isto, pôde-se distinguir as ESTs que correspondiam a genes ainda não identificados (genes novos), daquelas que possivelmente consistiram de artefatos, dado este muito importante para a evolução das pesquisas na área da genômica funcional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Genômica Funcional

O dogma central da biologia molecular foi proposto por Francis Crick, em 1957, e consiste na teoria de que as informações contidas nos genes, codificadas por seqüências nucleotídicas na forma de DNA, são copiadas (transcritas) para a estrutura de RNA (mRNA) e então traduzidas em informação funcional (proteína). Esta teoria tornou-se a base da hipótese de colinearidade, em que foi postulado que o arranjo linear das subunidades de DNA constituintes dos genes, correspondia à seqüência de aminoácidos das proteínas resultantes da expressão destes. Com a elucidação do código genético por dois grupos distintos em 1966 (Khorana e Nirenberg), tornou-se possível a predição da seqüência protéica com base na seqüência nucleotídica de um gene. No final da década de 70, foram desenvolvidas as primeiras técnicas de seqüenciamento de DNA (MAXAM; GILBERT, 1977; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), as quais sofreram algumas modificações, principalmente em relação à eficiência, mas que estão sendo empregadas com sucesso até os dias atuais (STERKY; LUNDEBERG, 2000).

A ciência conhecida como genômica pode ser dividida em quatro abordagens que muitas vezes se sobrepõem (BULFIELD, 2004):

- Construção de mapas do genoma, utilizando-se marcadores de DNA altamente variáveis, como microsátélites e polimorfismos de uma única base (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*), ou genes;
- Utilização de informações destes mapas e cruzamentos entre linhagens fenotipicamente variáveis (como linhagens de corte e postura), no intuito de identificar regiões do genoma contendo genes que afetem o(s) traço(s) de interesse: os conhecidos Loci de Traços Quantitativos (QTL, *Quantitative Trait Loci*);
- Identificação dos genes, dentro ou não de QTL, os quais são os verdadeiros responsáveis pelo(s) traço(s) de interesse;
- Busca pelo preenchimento do buraco existente entre as informações do gene e fenótipo, com o emprego das abordagens conhecidas como proteômica (*proteomics*), metabolômica (*metabolomics*) e análises de sistemas complexos.

Na genômica funcional, o enfoque é dado na informação funcional do genoma, ou seja, na parte do genoma que codifica proteínas. Pelo fato dos organismos superiores apresentarem apenas uma pequena parte do seu genoma constituído por seqüências codificadoras de proteínas (3% do genoma dos humanos), a construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) e seqüenciamento de etiquetas de seqüências expressas (ESTs, *Expressed Sequence Tags*) representa uma fonte valiosa e direta da informação funcional de um determinado tecido.

Esta metodologia foi descrita por Adams et al. (1991), onde clones de cDNA obtidos de cérebro humano foram parcialmente seqüenciados ao acaso. Nesta técnica, a população de RNA mensageiro (mRNA) de determinada célula/tecido é isolada e utilizada como molde para a construção de bibliotecas de cDNA por transcrição reversa. As ESTs são obtidas, seqüenciando-se as extremidades dos clones de cDNA, sendo que um único gene pode originar diferentes seqüências. As informações obtidas podem ser utilizadas para decifrar a função e organização do genoma, permitindo a localização cromossômica dos genes correspondentes; determinar o padrão de expressão dos genes de um determinado tecido, em diferentes condições ou estados fisiológicos; além de contribuir com a genética comparativa, possibilitando a determinação da função dos genes por meio de comparações entre espécies, mesmo geneticamente distintas (OKUBO et al., 1992; HATEY et al., 1998). Além disto, estas informações podem ser utilizadas para preencher as lacunas existentes no conhecimento em relação à evolução das espécies (MARRA; HILLIER; WATERSTON, 1998).

Outra aplicação desta metodologia é a identificação de SNPs. Estes têm emergido como a principal classe de marcadores de DNA, uma vez que permitem o desenvolvimento de mapas genéticos de alta densidade, adequados para a identificação de QTL, por meio de análises de desequilíbrio de ligação (SMITH; SHI; SMITH, 2002).

Embora o seqüenciamento ao acaso de ESTs forneça indícios sobre o nível de expressão dos genes identificados, existem abordagens mais específicas que devem ser empregadas com este objetivo, tais como *display* diferencial (LIANG; PARDEE, 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* – SAGE (VELCULESCU et al., 1995) e RT-PCR quantitativo (WATAKABE et al., 2001), entre outros. Metodologias que empregam a técnica de hibridização de ácidos nucléicos, em que “alvos” marcados fluorescente ou radioativamente, construídos a partir de RNA ou cDNA são hibridizados com “sondas” impressas em suportes sólidos - membranas de náilon, no caso de macro arranjos ou lâminas de vidro, no caso de micro arranjos têm sido cada vez mais

utilizadas. Destas, as abordagens empregando membranas de náilon como suporte e marcação radioativa dos alvos – os macroarranjos – têm recebido preferência por apresentarem baixo custo e rapidez na obtenção do resultado, em relação às demais metodologias empregadas para análise de expressão gênica (COX, 2001).

O princípio dos macroarranjos foi empregado pela primeira vez na investigação da expressão de genes de *Escherichia coli* por Chuang; Daniels; Blattner (1993). Esta metodologia consiste na impressão automatizada (NIZETIC et al., 1991) ou manual (SCHUMMER et al., 1999) de colônias de bactérias (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2006) ou somente os plasmídios contendo cDNA oriundos de bibliotecas (NOGUEIRA et al., 2003) ou produtos de PCR (SASAKI et al., 2001) em membranas de náilon e posterior hibridização com alvos marcados radioativamente, preferencialmente com ^{33}P (PASSOS; NGUYEN; JORDAN, 2000), construídos por transcrição reversa a partir da poluição de mRNA poli(A)⁺ de uma célula/tecido (BERNARD et al., 1996). A imagem resultante pode ser computada por um *phosphorimager* e analisada por *softwares* que quantificam o sinal de cada *spot*, sendo, a intensidade observada, proporcional à quantidade de mRNA de cada clone impresso, presente na amostra de RNA utilizada para a construção dos alvos marcados (COX, 2001).

2.2 Genômica Funcional de Aves

Além da incontestável importância na agricultura, a galinha ocupa lugar de destaque na árvore filogenética das espécies, uma vez que apresenta um ancestral comum com os mamíferos, há 300 – 350 milhões de anos. Sendo assim, qualquer avanço no conhecimento da biologia deste animal modelo, tão utilizado em estudos relacionados à biologia do desenvolvimento, virologia, oncogênese e imunologia, terá repercussão direta sobre os conceitos da evolução dos mamíferos e de outras aves, além de poder ter importante aplicação na medicina (ELLEGEN, 2005).

Por este motivo, a galinha foi o primeiro animal doméstico a ter seu genoma seqüenciado. No projeto desenvolvido no Centro de Seqüenciamento de Genoma da Escola de Medicina da Universidade de Washington, uma fêmea *Red Jungle Fowl* (*Gallus gallus gallus*) - linhagem selvagem ancestral da galinha doméstica (*G. g. domesticus*) - teve seu genoma seqüenciado, empregando-se a técnica de *shotgun*. Com o auxílio de vetores BACs (*Bacterial Artificial Chromossomes*), que possibilitam a clonagem de grandes fragmentos genômico (> 100 kb), foi

possível efetuar 6,6 vezes a montagem virtual destas seqüências, sendo que foi estimada uma cobertura de mais de 95% do genoma (BURT, 2004).

As informações oriundas deste projeto estão disponíveis publicamente e são de evidente importância. Poderão funcionar, por exemplo, como ferramentas para a elucidação da base molecular das variações genéticas existentes entre linhagens selecionadas artificialmente para as mais diversas finalidades. Com esta proposta, o Instituto Beijing de Genômica da Academia Chinesa de Ciências (2003) seqüenciou uma vez o genoma de três aves, sendo cada uma de uma linhagem distinta (corte, postura e uma linhagem ornamental - *Silkie*) e, por meio de comparações com o genoma referência, está construindo um banco de SNPs, sendo que 2,8 milhões de polimorfismos já foram identificados (ELLEGREN, 2005) e poderão ser utilizados em estudos de associação com caracteres fenotípicos de interesse.

Antes disso e agora paralelamente, diversos estudos vêm sendo realizados no intuito de aumentar as informações genômicas em aves. Em 2001, Smith et al. construíram uma biblioteca normalizada de cDNA de embriões inteiros de 10 dias de incubação de galinhas *White Leghorn*. As ESTs obtidas foram submetidas à identificação de SNPs, sendo que estes foram observados numa frequência de 1 SNP a cada 470 bases; comparações das seqüências genômicas entre galinha d'angola, pato japonês e peru doméstico, por meio da utilização de 10 pares de *primers* construídos a partir de 10 ESTs obtidas desta biblioteca (SMITH et al., 2001b); e comparações entre linhagens de corte e postura e identificação de SNPs linhagem específicos (SMITH; SHI; SMITH, 2002).

Um dos maiores projetos de seqüenciamento em larga escala de ESTs de galinhas foi desenvolvido por Boardman et al. (2002), onde 339.314 ESTs, oriundas de 64 bibliotecas de cDNA, foram seqüenciadas. Dos 85.486 contigs, apenas 38% apresentou ortólogos em outros organismos.

No intuito de aumentar os recursos genômicos e avaliar a expressão gênica global em tecidos de galinhas, Cogburn et al. (2003) construíram cinco bibliotecas normalizadas de cDNA, a partir dos seguintes tecidos: 1) fígado; 2) tecido adiposo; 3) musculatura peitoral, coxa e placa de crescimento epifisial; 4) hipófise, hipotálamo e glândula pineal; e 5) oviduto, ovário e testículo. Um total de 30.609 ESTs foi sequenciado e, após montagem, representantes das seqüências únicas (*contigs*) foram utilizados em experimentos de expressão (*microarray*), com o objetivo de identificar genes candidatos envolvidos no processo de crescimento, metabolismo e

vias regulatórias que controlem traços de produção importantes. Estas informações foram utilizadas no mapeamento e análise de QTL para teor de gordura abdominal e peso da musculatura peitoral na progênie F2 de cruzamentos entre duas linhagens de corte geneticamente divergentes quanto ao conteúdo de gordura abdominal (LAGARRIGUE et al., 2006). No trabalho de 2003, os autores publicaram os resultados do primeiro microarranjo que construíram, onde 3.456 clones foram amplificados (PCR) e impressos em membranas de náilon de 8 X 12 cm. Para construção dos alvos, foram empregados dois tratamentos, onde frangos de corte de quatro semanas de idade foram alimentados com ração 1) suplementada com T3 (1,25 ppm), ou com 2) 0,6% PTU, durante três semanas, para induzir um estado de hipertireoidismo e hipotireoidismo, respectivamente. Na sétima semana, amostras de fígado das aves foram coletadas e utilizadas para extração de RNA e síntese dos alvos. Com isto, eles identificaram vários genes diferencialmente expressos, dos quais muitos se apresentam envolvidos na via lipolítica e são controlados pelo eixo tireotrófico. Também com o objetivo de identificar diferenças genéticas capazes de explicar diferenças fenotípicas existentes entre linhagens de galinhas, Ka et al. (2005) utilizaram a metodologia de *macroarrays* para identificar genes diferencialmente expressos na região hipotalâmica de duas linhagens divergentes de frango quanto à composição corporal e comportamento alimentar.

O embrião da galinha tem se demonstrado um importante sistema modelo para a biologia do desenvolvimento e vem sendo exaustivamente empregado em estudos nesta área. Yamada et al. (2004) desenvolveram um trabalho em 2004, no intuito de identificar genes ligados ao cromossomo W de galinhas, expressos antes do processo de diferenciação das gônadas, construíram *macroarrays* de cDNA subtraído: “fêmea menos macho”, a partir de embriões de dois (estádio 12-13), três (estádio 19-20) e quatro dias (estádio 24-25). De 15.744 clones, 610 apresentaram expressão específica em fêmeas, dos quais 62 foram identificados, por meio de *southern blot*, como ligados ao cromossomo W. Num outro estudo, Jorge et al. (2004) construíram três bibliotecas de cDNA de embriões inteiros no estágio 26 de desenvolvimento; de somitos associados ao tubo neural (estágio 15); e da musculatura dos brotos de membros (estágios 21, 24 e 26), no intuito de identificar genes envolvidos na formação da musculatura (miogênese) durante o desenvolvimento embrionário de frangos de corte. Com a obtenção de 4.998 ESTs válidas, estes pesquisadores contribuíram com o GenBank, com 143 seqüências

novas para galinhas, sendo que destas, 45 ESTs apresentaram homólogos em humanos ou apresentaram similaridade com regiões conservadas de proteínas.

Recentemente, Savolainen et al. (2005) construíram quatro bibliotecas de cDNA à partir do cérebro e testículo das linhagens *junglefowl* e *White Leghorn*. Um total de 21.285 ESTs (extremidade 5' dos clones de cDNA) resultou em 12.549 seqüências únicas, sendo que 4.129 clones (32,9%) não apresentaram similaridade com os bancos de genes e proteínas e 1.649 (13,1%) não apresentaram similaridade com o banco de ESTs. Destas, um total de 180 ESTs apresentou fases de leitura aberta (ORF, *Open Reading Frame*), correspondendo a possíveis genes novos. Uma grande diferença nos níveis de expressão, com base na abundância dos transcritos entre as bibliotecas, foi observada entre cérebro e testículo, sendo que 84,3% das ESTs foram identificadas apenas na biblioteca deste último. Entre os 525 transcritos mais freqüentes, 20 apresentaram diferença no nível de expressão entre as duas linhagens.

Outra abordagem empregando a técnica de microarrays foi adotada por Burnside et al. (2005), em que foram construídos arranjos de cDNA, imprimindo-se 15.609 ESTs geradas pelo BBSRC (*Biotechnology and Biological Sciences Research Council*), Universidade de Delaware e Centro de Pesquisa do Câncer Fred Hutchinson, correspondentes a 24 tecidos de embriões e galinhas adultas, tecidos ligados ao sistema imunológico e uma linhagem celular da bursa (DT40) e 160 seqüências referentes a controles.

Diversos outros tecidos/sistemas de galinhas foram utilizados em estudos empregando construção de bibliotecas de cDNA e seqüenciamento de ESTs, tais como fígado (CARRE et al., 2001) e sistema imunológico (TIRUNAGARU et al., 2000; ABDRAKHMANOV et al., 2000; VAN HERMET et al., 2003; SMITH et al., 2004; MIN et al., 2005).

Os dados oriundos deste tipo de estudo têm sido utilizados para a identificação de SNPs (SMITH; SHI; SMITH, 2002; KIN et al., 2003), localização de regiões contendo microssatélites (DRANCHAK et al., 2003), além de diversas análises comparativas, como é o caso do estudo realizado por Reed et al. (2005). Neste último, comparações *in silico* (BlastN) foram efetuadas para determinar a posição de 877 ESTs de peru (*Meleagris gallopavo*) no genoma e identificar ortólogos em galinhas, sendo que 788 ESTs puderam também ser identificadas no genoma da galinha. Num outro estudo (CHAVES; ROWE; REED, 2005), 694 ESTs de embriões de perus (24 dias de incubação) foram seqüenciadas. As 437 seqüências únicas resultantes foram comparadas com o genoma da galinha, no intuito de identificar possíveis ligações éxon-intron.

Primers foram desenvolvidos para amplificar os íntrons correspondentes, possibilitando uma análise mais completa da sequência nucleotídica dos genes e a identificação de SNPs, os quais foram genotipados para análise de ligação em duas populações referências de perus.

Estes dados mostram que uma das principais abordagens empregadas em estudos desenvolvidos na área de genômica funcional de aves tem o objetivo de identificar a base molecular responsável pelas diferenças fenotípicas observadas entre linhagens, sendo que recentemente, Bourneuf et al. (2006) realizaram um estudo empregando a técnica de *microarray* para identificar genes diferencialmente expressos no fígado de frangos de linhagens com diferente teor de gordura (*lean X fat*). Neste estudo, os autores constataram que o gene codificador do citocromo P450 2C45 foi mais expresso em aves “magras” e aqueles codificadores da ácido graxo sintase, esterol-CoA desaturase, fator 1 ligante do elemento de resposta a esterol e fator 4 nuclear de hepatócito foram mais expressos nas aves mais “gordas”.

2.3 Desenvolvimento e Crescimento das Aves

2.3.1 Crescimento animal

A principal definição de crescimento é o aumento do tamanho e ganho de peso do animal, porém uma ave adulta pode apresentar aumento do ganho de peso, devido à deposição de gordura corporal, o qual não pode ser relacionado ao crescimento. Sendo assim, o aumento do tamanho observado em aves jovens ocorre devido ao aumento da proteína corporal, que acontece em um período limitado da vida do animal (GONZALVES; ROBERTO, 2002).

Pelo fato do tecido muscular ser o principal tecido corporal constituído por proteínas, pode-se dizer que o desenvolvimento deste seja um fator preponderante para o crescimento animal. Por outro lado, o desenvolvimento muscular depende diretamente do desenvolvimento do tecido ósseo, o qual atua como suporte. Sendo assim, há uma hierarquia no desenvolvimento destes tecidos, sendo que primeiramente o tecido ósseo é desenvolvido, seguido pelo muscular e posteriormente o adiposo. Para que haja esta hierarquia, o fluxo de nutrientes é direcionado para determinados tecidos de acordo com a fase de desenvolvimento do animal. Este processo é controlado por hormônios e seus receptores, mas pode sofrer influência de fatores genéticos, metabólicos e do próprio ambiente (GONZALVES; ROBERTO, 2002).

2.3.2 Fatores hormonais que atuam sobre os processos fisiológicos

O sistema endócrino das aves é constituído pela hipófise, par de tireóides, paratireóides, adrenais, pâncreas, gônadas, glândulas ultimobranquiais e intestino. Embora o timo e a glândula pineal sejam muitas vezes classificados com órgãos endócrinos, suas funções nas aves não estão bem estabelecidas (STURKIE, 2000).

Destes órgãos, a hipófise é considerada a glândula mestra, uma vez que controla direta ou indiretamente a função das demais glândulas, por meio da ação de seus hormônios. Porém, ela não executa esta tarefa sozinha, sua ação é controlada positiva e negativamente pelo hipotálamo - estrutura que exerce a importante função de ligar os sistemas endócrino e nervoso.

A eminência mediana hipotalâmica é um ponto de integração final de informações geradas em diferentes regiões do organismo. Essas informações, depois de serem processadas e passarem por um ajuste fino, são transmitidas simultaneamente para o córtex cerebral e hipófise, por meio de diversos mecanismos, modificando todas as secreções endócrinas do animal (STURKIE, 2000). A atuação do hipotálamo é efetuada por meio da secreção de seus hormônios que atuam de maneira trófica sobre células específicas da hipófise. Estas, por sua vez, respondem, secretando hormônios necessários para o crescimento, desenvolvimento, metabolismo, reprodução e funções normais do sistema nervoso.

Pelo menos seis hormônios hipotalâmicos são responsáveis pelo controle hipofisário (DUKES, 1996; AIRES, 1999):

- Hormônio liberador de tireotrofina (TRH), o qual estimula a síntese e liberação dos hormônios tireoestimulante (TSH) e prolactina (PRL);
- Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que atua positivamente na síntese e liberação dos hormônios gonadotróficos folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH);
- Somatostatina (GHRH), o qual inibe a secreção dos hormônios tireoestimulante (TSH) e de crescimento (GH);
- Somatocrinina (GHRH), que atua positivamente na síntese e liberação do hormônio de crescimento;
- Hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH);

- Dopamina que inibe da liberação de prolactina (PRL).

Diferentemente dos mamíferos, nas aves, a hipófise é constituída apenas por um lobo anterior - conhecido como adenohipófise - e um posterior - a neurohipófise - os quais apresentam diferentes origens embrionárias. O lobo intermediário apresenta-se ausente nesta espécie e o hormônio por ele liberado nos mamíferos, a melanotropina (MSH), é sintetizado e secretado por células da adenohipófise (KLEINHOLZ; RAHN, 1940). A separação entre os lobos anterior e posterior é efetuada por uma fina camada de tecido conjuntivo.

A neurohipófise tem origem embrionária neuronal e, por este motivo, não possui células capazes de sintetizar hormônios. Os hormônios vasotocina, mesotocina e oxitocina, liberados por este lobo hipofisário nas aves, são, na verdade, sintetizados por células presentes nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo. Após sua síntese, estes hormônios são transportados pelos axônios e armazenados nos grânulos secretores presentes na parte terminal destes nervos, localizados no lobo posterior.

Já a adenohipófise, tem origem epitelial e é composta por cinco tipos celulares distintos: tireotrofos, lactotrofos, corticotrofos, somatotrofos e gonadotrofos, que sintetizam os hormônios tireotropina, adeno-corticotrófico, de crescimento e as gonadotrofinas (hormônios luteinizante, folículo-estimulante e prolactina) e melanotropina (STURKIE, 2000).

A vasotocina é um hormônio de efeito antidiurético, cuja secreção é estimulada pelo aumento da osmolaridade do sangue circulante, diminuição do volume sanguíneo, hipotensão, hipoglicemia aguda e exposição do animal ao calor. Na galinha, a mesotocina apresenta propriedades farmacológicas similares às da oxitocina, a qual atua no útero, participando do processo de postura (DUKES, 1996).

Os hormônios luteinizante e folículo-estimulante estão relacionados com a reprodução, o primeiro induzindo a ovulação e estimulando a esteroidogênese e o segundo estimulando o crescimento dos testículos e maturação dos espermatozóides nos machos ou a função ovariana nas fêmeas (DUKES, 1996).

A prolactina, hormônio que provoca a secreção do leite nos mamíferos, exerce diversos efeitos sobre o cérebro das aves, tais como controle do comportamento parental (BUNTIN; LEA; FIGGE, 1988; BRIDGES et al., 1990; YOUNGREN et al., 1991), comportamento sexual (BAILEY; HERBERT, 1982; HARLAN; SHIVERS; PFAFF, 1983), atividade sono/vigília (ROKY; VALATX; PAUT-PANGO, 1994), cortejo (DRAGO et al., 1980), apetite (MOORE et

al., 1986; LI; KELLY; BUNTIN, 1995) e secreção de gonadotrofinas (SARKAR; YEN, 1985; BUNTIN; LEA; FIGGE, 1988).

A melanotropina é responsável, nos répteis, pela expansão dos melanóforos presentes na pele, porém em aves, sua função continua incerta (KLEINHOLZ; RAHN, 1940).

O hormônio tireoestimulante ativa todas as etapas que envolvam a biossíntese e liberação dos hormônios tireoideanos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). Estes hormônios são necessários para um crescimento e desenvolvimento normal dos animais, sendo que tireoidectomia causa, nas aves, características semelhantes às apresentadas no nanismo e obesidade. Já o hormônio adrenocorticotrófico, estimula a secreção de glucocorticóides, mineralocorticóides e esteróides androgênicos pelo córtex das adrenais (STURKIE, 2000).

2.3.3 Importância da hipófise e hipotálamo para o crescimento animal

A existência de um hormônio que pudesse ser o responsável pelo crescimento somático dos animais foi sugerida por Evans e Long, em 1921. Em seus experimentos preliminares, estes pesquisadores constataram que a administração de extrato da hipófise de bovinos recém abatidos a ratos jovens hipofisectomizados era capaz de fazer com que estes apresentassem crescimento normal. Porém, o isolamento do hormônio responsável por esta reversão do quadro de retardo do crescimento só foi efetuado em 1944, por Li e Evans.

Hoje, sabe-se que diversos hormônios estão envolvidos no controle dos processos de crescimento e metabolismo intermediário, sendo que os principais podem ser divididos em três grupos:

- hormônio de crescimento (GH) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs)
- hormônios tireoideanos e demais fatores de crescimento
- esteróides

Dos sistemas responsáveis por controlar o crescimento pós-natal do animal, o eixo somatotrófico (Figura 1), que compreende os hormônios somatocrinina, somatostatina, GH e IGFs apresenta papel principal, embora todos estes hormônios sejam importantes na manutenção do peso corporal e preparo do animal para a fase reprodutiva.

Maiores concentrações plasmáticas de GH coincidem com o período de máximo ganho de peso da ave. Porém DECUYPERE et al. (1991), fazendo comparações entre populações, revelaram que não há correlação entre taxa de crescimento e níveis plasmáticos de GH.

Porém, estudos desenvolvidos por BUYSE; DECUYPERE (1994) revelaram que a amplitude máxima do pico de secreção deste hormônio está, na verdade, relacionada com a eficiência de conversão protéica e não com o ganho de peso corporal em si.

O GH presente na circulação atua sobre os tecidos alvos de maneira (1) direta, como ocorre no metabolismo de lipídios e gordura, onde apresenta efeitos contrários aos exercidos pela insulina, porém que se assemelham aos do cortisol e de maneira (2) indireta, como no músculo e metabolismo de proteínas, em que seus efeitos são mediados pelo fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1). Este é sintetizado por diversos tecidos, principalmente pelo fígado e atua por mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos (DUCLOS; BACCAVIN; SIMON, 1999). Alguns trabalhos demonstram que a síntese e secreção hepática de IGF-1 são dependentes do GH, enquanto que a extra-hepática parece ser independente deste hormônio (ROSSELOT et al., 1995; TANAKA et al., 1996).

Porém, o GH só será biologicamente ativo após sua associação a receptores (GHR) localizados na membrana plasmática das células alvo. A existência de linhagens anãs de frangos, cujos receptores apresentam alguma mutação ilustra este princípio (DECUYPERE et al., 1991; BURNSIDE et al., 1992).

O GH exerce muitas de suas funções por meio da regulação da transcrição de genes específicos, incluindo os que codificam IGF-I, fatores de transcrição e enzimas metabólicas. Para isto, duas moléculas de GH devem se ligar ao GHR (CUNNINGHAM et al., 1991). A formação deste homodímero promove uma mudança conformacional dos receptores, fazendo com que os domínios intracelulares destes passem a se associar a uma tirosina kinase da família Janus (JAK2), promovendo a ativação desta. Com sua ativação, esta proteína fosforila a si mesma e ao domínio intracelular do GHR ao qual se encontra acoplada em múltiplos sítios, bem como outros substratos como proteínas STATS e MAP kinase. As STATS fosforiladas dimerizam-se, desassociam-se do complexo e deslocam-se para o núcleo da célula, onde irão se ligar a elementos de resposta e afetar a expressão de genes alvos. Já a MAP kinase irá ativar genes que atuarão como fatores trans-ativadores e de outros fatores como Spi 2.1, c-fos e c-jun, os quais irão afetar a transcrição de genes, tais como o *IGF-I*, *p450SC*, *MUP* e de proteínas ligantes de IGF-I, embora a ativação da transcrição do gene que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) seja o elemento chave para a promoção de crescimento, desencadeada pela ligação do GH ao seu receptor (NORMAN; LITWACK, 1997).

Uma segunda via de sinalização do GH importante para a regulação da transcrição gênica, é a via da Ras-MAP Kinase (proteína que ativa a mitogênese). O GH ativa esta via por meio da JAK2, que fosforila a proteína SHC (SMIT et al., 1999).

No tecido adiposo, o GH atua de forma oposta à insulina, promovendo uma diminuição da lipogênese e aumento da lipólise, acarretando, desta forma, uma redução da gordura corporal do animal. Os mecanismos de sinalização pelos quais o GH regula este processo estão começando a ser explorados. O GH parece inibir a diferenciação do adipócito primário, atuando negativamente sobre a transcrição de genes requeridos para tal processo (HANSEN et al., 1998). Um evento de sinalização que parece estar envolvido é a ativação da fosfodiesterase específica de AMP cíclico, por meio de um mecanismo dependente da fosfatidil-3-kinase (MACKENZIE et al., 1998). Já o estímulo da lipólise, executado pelo GH, parece envolver os mesmos mecanismos envolvidos na atividade dos glucocorticóides, onde há uma inibição da proteína Gi, o que promove um aumento no acúmulo de cAMP (YIP; GOODMAN, 1999).

No tecido muscular, o GH atua principalmente por meio do IGF-I, o qual consiste num hormônio peptídico estruturalmente relacionado à insulina (DUCLOS; BACCAVIN; SIMON, 1999). A maior parte do IGF-I circulante, encontra-se acoplada a proteínas ligantes, que têm como função proteger estes fatores da degradação e regular sua biodisponibilidade.

O IGF-I livre liga-se ao receptor do tipo I (IGF-IR), o qual apresenta 84% de similaridade com o receptor de insulina (CZECH, 1986). Este receptor é uma glicoproteína pertencente à família dos receptores de membrana tirosina kinase do tipo 2 (ULLRICH; SCHLESSINGER, 1990), constituída por duas subunidades α que se ligam ao IGF-I e duas subunidades β que atravessam a membrana. Se a insulina estiver presente em grande quantidade (condições *in vitro*), também poderá se ligar a este receptor, porém este apresenta uma afinidade de 10 a 100 vezes maior ao IGF-I, o que explica sua especificidade (LEROITH et al., 1995).

Primeiramente, o IGF-I se liga às subunidades extracelulares α do heterodímero IGF-IR, ativando o domínio intracelular da tirosina kinase. Esta ativação, como demonstrado na Figura 2, promove a auto-fosforilação do receptor, o que promove a ligação de diversas moléculas sinalizadoras, compreendendo membros das cinco principais famílias de substratos: família GRB (proteínas ligadoras do receptor de fatores de crescimento), SHC, IRS (substrato do receptor de insulina), CRK e da subunidade regulatória de 85 kDa da PI3'-kinase (ULLRICH; SCHLESSINGER, 1990; LEROITH et al., 1995). Estes substratos desencadeiam uma cascata de sinalização que envolve a ativação da PI3'-K e AKT, bem como a via Ras-Raf-MAPK (LEROITH et al, 1995), a qual promoverá proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula (CROSS et al., 2000).

A sinalização por meio da ERK1 e 2, as quais correspondem a subfamílias da MAPK, desempenha papel fundamental no estímulo da proliferação celular, uma vez que sendo translocadas para o núcleo, induzem a expressão de genes que irão promover o início do ciclo celular (GREULICH; ERIKSON, 1998).

Figura 2 - Vias de sinalização promovidas pela ligação do IGF-I ao seu receptor (modificado de LEROITH et al., 1995)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens Utilizadas

Duas linhagens geneticamente distintas, provenientes da EMBRAPA suínos e aves (Concórdia, SC), foram utilizadas: uma linhagem de corte (TT) e uma de postura (CC).

A linhagem TT consiste numa linha macho originada do cruzamento das raças *Cornish*, *Hampshire* e *Plymouth Rock*, que vem sendo selecionada para produção de carne desde 1985. No início do programa, a pressão de seleção foi concentrada nas características de ganho de peso e traços de carcaça e, a partir de 1992, os machos desta linhagem passaram a ser selecionados também, com base na taxa de conversão alimentar.

A linhagem CC é uma linha fêmea da raça *White Leghorn* selecionada inicialmente (1989) para produção de ovos e posteriormente (a partir de 1992) para peso e qualidade dos ovos.

A tabela 1 mostra dados referentes ao peso da musculatura peitoral, dos ovos e das aves das linhagens TT e CC tanto na fase embrionária, quanto pós-eclosão (ALVES, 2004) e a figura 3 evidencia as diferenças fenotípicas existentes entre estas aves.

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos pesos de ovos, peso corporal e peso do músculo peitoral de aves da linhagem CC e TT nas fases: embrionária e pós-eclosão (ALVES, 2004)

Idade	n	Peso do ovo (g)		Peso corporal (g)		Peso do músculo (g)	
		TT	CC	TT	CC	TT	CC
E9	10	70,49*** ± 1,3	59,33*** ± 1,3	1,53* ± 0,04	1,39* ± 0,04	-	-
E17	10	64,86*** ± 1,7	52,38*** ± 1,7	22,17** ± 0,9	17,71** ± 0,9	0,282*** ± 0,01	0,193*** ± 0,01
D1	10	-	-	51,97*** ± 1,5	39,19*** ± 1,5	0,449** ± 0,02	0,317** ± 0,02
D21	10	-	-	778,5*** ± 21,3	218,6*** ± 21,3	42,48*** ± 1,4	7,73*** ± 1,4

E9: 9 dias de incubação; E17: 17 dias de incubação; D1: 1 dia de idade; D21: 21 dias de idade; TT: linhagem de corte; CC: linhagem de postura. *** p < 0,01; ** p < 0,05; * p < 0,10.

Figura 3 - Fotografia de duas aves, uma da linhagem TT e outra da linhagem CC, aos 21 dias de idade

3.2 Obtenção dos Ovos e Criação das Aves

Cerca de 60 ovos de cada linhagem, concedidos pela EMBRAPA Suínos e Aves, foram incubados sob atmosfera úmida, aquecida a 37°C.

Após eclosão, os pintos foram alojados no glapão do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, onde receberam ração inicial comercial para frango de corte e água *ad libitum* e ficaram expostos à temperatura ambiente (TA) e luz contínua, até completarem 21 dias de idade.

A composição básica da ração oferecida às aves consistiu em farelo de soja, milho integral moído (61,9%), óleo vegetal e premix mineral vitamínico aminoácido, sendo eventuais substitutivos: farelo de arroz desengordurado, farelo de soja extrusado, farelo de trigo, sorgo integral moído, protenose e trigo integral. Os componentes de enriquecimento e níveis de garantia estão relacionados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Relação dos componentes de enriquecimento por kg de ração oferecida às aves

Componente	Quantidade/kg
Ácido fólico	0,6 mg
Antioxidante	100 mg
Coccidiostático	100 mg
Promotor de crescimento	40 mg
Cobre	8 mg
Ferro	50 mg
Iodo	1,4 mg
Lisina	0,35 g
Manganês	72 mg
Metionina	1,8 mg
Selênio	0,2 mg
Sódio	1,6 mg
Vitamina A	8000 UI
Vitamina B12	15 mcg
Vitamina D3	3000 UI
Vitamina E	20 mg
Vitamina K3	1,5 mg
Zinco	54,15 mg
Pantotenato de cálcio	12 mg
Niacina	40 mg
Cloreto de colina	0,34 g
Biotina	100 mcg
Piridoxina	3 mg
Tiamina	2 mg
Riboflavina	6 mg

Tabela 3 - Relação dos níveis de garantia dos constituintes da ração oferecida

Componente	%
Cálcio (máximo)	1,5
Extrato etéreo (mínimo)	2,5
Fósforo (mínimo)	0,6
Matéria fibrosa (máximo)	5,0
Matéria mineral (máximo)	7,0
Proteína bruta (mínimo)	20,0
Umidade (máximo)	12,0

3.3 Coleta da Hipófise e Hipotálamo das Aves e Extração do RNA Total

Ao completarem 21 dias de idade, as aves das linhagens TT e CC foram sacrificadas por deslocamento cervical e tiveram a hipófise e hipotálamo extraídos, como demonstrado na figura 4, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Figura 4 - Fotografias do procedimento de coleta da hipófise e hipotálamo

Estas estruturas foram armazenadas em nitrogênio líquido até serem utilizadas para extração do RNA total, segundo método proposto por Chomczynski e Sacchi (1987). Para isto, os tecidos coletados de 20 aves de cada linhagem foram macerados na presença de nitrogênio líquido e homogeneizados em *TRIZOL* - *Invitrogen* (750 μ l *TRIZOL*/0,1 g de tecido). Acrescentou-se a cada tubo eppendorf de 1,5 mL contendo as amostras, 250 μ L de água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato (água DEPC) e, após incubação à TA por cinco minutos, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio. Após incubação à TA por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C e a fase líquida resultante foi transferida para um tubo novo contendo 500 μ L de álcool isopropílico. Após homogeneização e incubação à TA por mais 10 minutos, as amostras foram centrifugadas novamente a 12.000 g por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado, adicionando-se 1 mL de etanol 75% para RNA (75% de etanol absoluto e 25% de água DEPC). Centrifugaram-se as amostras a 7.500 g por cinco minutos, a 4°C e, após descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco a 37°C (aproximadamente 15 minutos) e ressuscitado em 20 μ L de água DEPC ou quantidade suficiente para diluição do mesmo. As amostras de RNA total foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm, considerando que 1 unidade de OD₂₆₀ seja equivalente a 40 μ g/mL, avaliadas quanto a pureza, analisando-se a relação dos comprimentos de onda 260/280 nm, e quanto a integridade, efetuando-se eletroforese em gel de agarose 1%.

3.4 Isolamento do RNA Mensageiro (mRNA)

O conjunto de mRNA foi isolado da população de RNA total extraída da hipófise e hipotálamo das aves CC e TT por meio do *kit Oligotex (Qiagen)*. Um total de 500 µg de RNA total de cada *pool*, com volume ajustado com água DEPC para 1 mL (500 ng/µL) foi utilizado. Adicionou-se às amostras, 500 µL de tampão de ligação OBB e 45 µL da resina oligo dT₃₀ do *kit* que, após vigorosa homogeneização e incubação a 70°C por três minutos (quebra das estruturas secundárias do RNA) e posteriormente à temperatura ambiente (TA) por 10 minutos (hibridização entre a resina e a cauda poli-A do mRNA), foram centrifugados a 14.000 g por dois minutos, à TA. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL limpo, identificado como eluato 1 e guardado até a certificação de que a ligação e eluição do mRNA poli(A)⁺ ocorreram de maneira satisfatória. Adicionou-se 400 µL do tampão de lavagem OW2 ao precipitado de cada amostra e, após completa homogeneização e transferência desta solução para a coluna do *kit*, efetuou-se centrifugação a 14.000 g por um minuto, à TA. As colunas foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL limpos e a elas foram adicionados 400 µL de tampão de lavagem OW2. Após centrifugação a 14.000 g por um minuto, à TA, as colunas foram transferidas uma segunda vez para tubos limpos e a elas foram acrescentados 100 µL de tampão de eluição OEB, aquecidos a 70°C. Após ressuspensão das resinas, efetuou-se centrifugação a 14.000 g por um minuto, à TA e repetiu-se o procedimento de eluição do mRNA poli(A)⁺, acrescentando-se 100 µL do tampão de eluição à coluna e centrifugando-se novamente.

O mRNA isolado foi seco à TA, ressuspensionado em 7 µL de água DEPC e teve sua qualidade analisada, efetuando-se eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5 Construção das Bibliotecas de DNA Complementar (cDNA)

As bibliotecas de cDNA foram construídas e os insertos foram direcionalmente clonados, utilizando-se o *Kit SuperscriptTM Plasmid System with GatewayTM Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen)*, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.5.1 Síntese da primeira e segunda fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, 2 µL do *primer* adaptador *NotI* (*primer* oligo-dT que se anela à cauda poli-A do mRNA) foram adicionados às amostras de mRNA (Figura 5) e incubados a 70°C por 10 minutos. Após resfriamento em gelo, foram adicionados às amostras os seguintes reagentes:

5X tampão da primeira fita*	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
10 mM <i>mix</i> de dNTP	1 µL
[α - ³² P] dCTP (1 µCi/µL)	1 µL
Enzima <i>SuperScript II RT</i>	4 µL

* 250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂

Após a conclusão da reação de síntese da primeira fita (duas horas em banho, a 37°C), adicionou-se os reagentes listados abaixo para a síntese da segunda fita do cDNA (Figura 5):

Água DEPC	93 µL
5X tampão segunda fita*	30 µL
10 mM <i>mix</i> de dNTP	3 µL
<i>E. coli</i> DNA ligase (10 U/µl)	1 µL
<i>E. coli</i> DNA polimerase I (10 U/µl)	4 µL
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)	1 µL

* 100 mM Tris-HCl (pH 6.9); 450 mM KCl; 23 mM MgCl₂; 0.75 mM β-NAD⁺; 50 mM (NH₄)₂SO₄

Esta reação foi incubada a 16°C por duas horas, em seguida adicionou-se 2 µL da enzima T4 DNA polimerase (10 U) e incubou-se a reação por cinco minutos a 16°C. As amostras foram colocadas em gelo e 10 µL de EDTA 0,5 M e 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados para precipitação do cDNA. Após homogeneização e centrifugação por cinco minutos, a 14.000 g, aproximadamente 140 µL da fase aquosa foram transferidos para um tubo limpo, ao qual se acrescentou 70 µL de NH₄OAc 7,5 M e 500 µL de etanol absoluto resfriado. Os reagentes foram homogeneizados e, após centrifugação a 14.000 g por 20 minutos, a TA, o sobrenadante foi descartado. Para lavagem do cDNA, 500 µL de etanol 70% resfriado

foram adicionados e, após centrifugação a 14.000g por cinco minutos, à TA, descartou-se o sobrenadante. O cDNA foi seco em placa aquecedora a 37°C, por aproximadamente 10 minutos e ressuspensionado em 25 µL de água DEPC.

Figura 5 - Esquema resenativo da clonagem direcionada

3.5.2 Adição do adaptador *SalI*

Um novo sítio de restrição foi adicionado, desta vez às duas extremidades do inserto, para o reconhecimento da extremidade 5' no plasmídeo pSPORT1, como representado na figura 5. Para isto, os reagentes descritos abaixo foram adicionados, com posterior homogeneização e incubação a 16°C por 16 horas:

5X tampão da T ₄ DNA ligase *	10 µL
Adaptador <i>SalI</i>	10 µL
Enzima T ₄ DNA ligase	5 µL

* 5x T4 DNA ligase *buffer*: 250 mM Tris-HCl (pH 7.6); 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT, 25% (w/v) PEG 8000

Para precipitação do cDNA, 50 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados, seguido de completa homogeneização e centrifugação a 14.000 g por cinco minutos, à TA. Transferiu-se 45 µL da fase aquosa para um tubo limpo e adicionou-se 25 µL de NH₄OAc 7,5 M e 150 µL de etanol absoluto resfriado. Após homogeneização e centrifugação a 14.000 g por 20 minutos, à TA, o sobrenadante foi descartado. O cDNA foi lavado, adicionando-se 500 µL de etanol 70%, seguido por centrifugação a 14.000 g por dois minutos, à TA e descarte do sobrenadante. Para completa evaporação do etanol residual, o cDNA foi seco a 37°C, por aproximadamente 10 minutos e ressuspensionado em 40 µL de água DEPC.

3.5.3 Digestão com *NotI*

Esta etapa promoveu a digestão do adaptador *SalI* que havia sido adicionado à extremidade 3' dos insertos, de maneira a permitir a identificação de diferentes sítios de restrição em cada extremidade do inserto: *SalI* na extremidade 5' e *NotI* na extremidade 3', como demonstrado na figura 6. Para isto, 5 µL do tampão *React 3* e 4 µL de *NotI* foram adicionados. Após homogeneização e incubação a 37°C por duas horas, o cDNA foi precipitado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), como descrito anteriormente.

3.5.4 Coluna cromatográfica

O cDNA ressuspensionado em 100 µL de tampão TEN (NaCl 25 mM; EDTA 0,1 mM e Tris HCl pH 7,5 10mM) foi mantido no gelo durante as quatro lavagens da coluna cromatográfica do *kit*, com 800 µL de tampão TEN cada uma. O cDNA foi inserido no topo da coluna e o efluente foi coletado em um tubo identificado como tubo1. Adicionou-se à coluna, 100 µL do tampão TEN e o efluente foi coletado no tubo 2. Repetiu-se a aplicação de 100 µL de TEN na coluna,

porém, desta vez, foi coletada apenas uma gota (~ 35 µL) por tubo. Aliquotas de 100 µL de TEN foram continuamente adicionadas, até a obtenção de 18 gotas, uma por tubo, nos tubos enumerados de 3 a 20.

De acordo com as especificações dos fabricantes do *kit*, as frações referentes aos tubos enumerados de 9 a 14, continham os fragmentos de tamanho ideal para a reação de ligação no plasmídeo pSPORT1. Sendo assim, para certificação do tamanho dos fragmentos de cDNA, essas frações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (5 µL de cada fração e 2 µL de bromofenol) e comparadas com o padrão de peso molecular 1 Kb *ladder*. Após eletroforese de 85 V por aproximadamente uma hora, o gel foi transferido para uma membrana *Millipore* de 0,025 µm e seco no *Slab Gel Dryer SGD 2000 (Savant)* por uma hora. A membrana foi inserida num cassete contendo um *Imaging Plate* (IP, Kodak), o qual após exposição por 48 horas, foi revelado com o auxílio do equipamento *Storm 860 Molecular Dynamics (GE Healthcare - Amersham Biosciences)*.

As frações contendo os maiores fragmentos de cDNA foram precipitadas com a adição de 5 µL de tRNA de levadura, 0,5 volume de NH₄OAc e 2,5 volumes de etanol absoluto e centrifugação a 14.000 g por 20 minutos, à TA. Após descarte do sobrenadante, 500 µL de etanol 70% resfriado foram adicionados e centrifugou-se a 14.000 g por cinco minutos, à TA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e ressuspendido em 10 µL de água Milli-Q estéril.

3.5.5 Ligação do cDNA ao vetor pSPORT 1

Para a ligação dos insertos de cDNA ao plasmídeo pSPORT 1, foram adicionados a 2 µL de cDNA, os seguintes reagentes:

5X tampão da T ₄ DNA ligase	2 µL
pSPORT 1 <i>NotI-Sall-Cut</i>	0,5 µL
Água Milli-Q estéril	4,5 µL
Enzima T ₄ DNA ligase	1 µL

A reação foi incubada a TA por três horas e precipitada, adicionando-se 6 µL de NH₄OAc 7,5 M, 2,5 µL de tRNA de levedura e 35 µL de etanol absoluto resfriado. Após centrifugação a

14.000 g por 20 minutos, à TA, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500 µL de etanol 70% resfriado. As amostras foram centrifugadas a 14.000 g por dois minutos, à TA, o sobrenadante foi novamente descartado, e o precipitado foi seco a 37°C e ressuspenso em 5 µL de água Milli-Q estéril.

3.5.6 Transformação por eletroporação em célula competente EletroMAX™ DH10B™

Para realização da transformação, por eletroporação, dos insertos de cDNA ligados ao plasmídeo pSPORT 1 em *E. coli* DH10B (*Invitrogen*), 20 µL da solução de células, descongelada no gelo, foram adicionados a 1 µL do produto da reação de ligação. Após completa homogeneização, a solução foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm, a qual foi inserida no eletroporador *BTX-ECM 399 (BTX)*. Para eletroporação foram usadas as seguintes condições:

- Capacitância: 25 uFD
- Resistência: 200 OHMS
- Voltagem: 2,5 kvolts

Após o choque, 1 mL de meio SOC foi adicionado à cubeta, homogeneizado, transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL limpo e incubado a 37°C por uma hora, sob agitação a 220 rpm. O produto da transformação foi diluído, transferindo-se 100 µL deste para um tubo contendo 900 µL de meio SOC. Plaqueou-se 200 µL desta diluição em uma placa de petri contendo meio LB-Ágar 1,2% com ampicilina (100 mg/mL) e 100 µL de X-gal (20 mg/mL). As bactérias foram crescidas a 37°C por 16 horas.

3.6 Mini-preparação do DNA Plasmidial

As colônias de coloração branca foram inoculadas em placas de 96 poços contendo 1 mL de meio de cultura *Circle Grow* com ampicilina (100 mg/mL) por poço, e incubadas a 37°C por 22 horas, sob agitação a 300 rpm.

Placas de estoque foram preparadas, adicionando-se 100 μ L da cultura a 100 μ L de glicerol 50% autoclavado, e estocadas a -80°C .

Para sedimentação das células, as placas foram centrifugadas a 3.200 g por seis minutos, à TA, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 240 μ L de GET (glicose 20%; EDTA 0,5 M, pH 8,0 e Tris-HCl 1M, pH 7,4) ao precipitado e, após homogeneização, repetiu-se a centrifugação. Descartou-se novamente o sobrenadante e 80 μ L de GET foram adicionados ao precipitado. Após homogeneização, 60 μ L desta suspensão foram transferidos para uma microplaca de 250 μ L de polipropileno de fundo redondo (tipo Elisa) contendo 2,5 μ L de RNase (10 mg/mL). Adicionou-se 200 μ L da solução tensoativa composta por NaOH 0,2 N e SDS 1% e, após homogeneização, incubou-se a placa por 10 minutos à TA. Foram, então, acrescentados 60 μ L de KOAc 3 M resfriado a 4°C , homogeneizou-se e, após incubação a 90°C por 30 minutos e resfriamento em gelo por 10 minutos, centrifugou-se a 3.200 g por quatro minutos, à TA. A solução foi transferida para uma placa-filtro *Millipore* (MAGV N22) encaixada no topo de uma microplaca de fundo em “V” de 250 μ L de polipropileno e centrifugada a 3.200 g por quatro minutos, à TA. A placa-filtro foi descartada e 110 μ L de isopropanol foram adicionados ao filtrado, com posterior homogeneização. Em seguida, centrifugou-se a 3.200 g por 45 minutos à TA, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA plasmidial com 200 μ L de etanol 70% resfriado. Após centrifugação a 3.200 g por cinco minutos, à TA, o precipitado foi seco à TA por uma hora e ressuspendido em 40 μ L de água Milli-Q estéril.

A qualidade e concentração dos clones obtidos foram avaliadas efetuando-se eletroforese em gel de agarose 1% e comparando-se as bandas obtidas com as do padrão de peso molecular pGEM4Z (40 ng/ μ l).

3.7 PCR da Mini-preparação Plasmidial

Para verificação do tamanho dos insertos de cDNA clonados, efetuou-se uma PCR (reação de polimerização em cadeia) do produto da mini-preparação plasmidial de uma placa. Para isto, foram adicionados a 1 μ L do DNA plasmidial:

Tampão 10X *	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
Solução de dNTPs (10 mM)	0,5 µL
Primer M13 direto (3,2 pmol/µL) **	1,0 µL
Primer M13 reverso (3,2 pmol/µL) ***	1,0 µL
Água Milli-Q estéril	17,1 µL
Enzima Taq DNA polimerase	0,4 µL

* 10mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl e 0,1% Triton X-100

** 5'- GTAAAACGACGGCCAGT- 3'

*** 5'- AACAGCTATGACCATG- 3'

As condições de tempo e temperatura empregados na PCR foram:

Temperatura	Tempo	Nº repetições
95°C	3 minutos	1
95°C	1 minuto	35
50°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	3 minutos	1
4°C	∞	

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1% para verificação da existência e do tamanho dos insertos clonados.

3.8 Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada segundo protocolo modificado descrito pelos fabricantes do kit *Dyenamic ET Terminator Sequencing* (GE Healthcare – Amersham Biosciences), adicionando-se 1 µL de DNA (~ 100 ng) ao *mix* preparado com os seguintes reagentes:

Tampão <i>Save Money</i> *	2 µL
Primer T7 (5 pmol/µL) **	1 µL
<i>Dyenamic ET Terminator</i>	2 µL
Água Milli-Q estéril	4 µL

* 200mM de Tris pH 9; 0,5 mM MgCl₂

** 5'- TAATACGACTCATATAGGG- 3'

As condições de tempo e temperatura para esta reação foram:

Temperatura	Tempo	Nº repetições
96°C	2 minutos	1
96°C	45 segundos	25
50°C	30 segundos	
60°C	4 minutos	
4°C	∞	

3.9 Purificação e Aplicação da Reação de Sequenciamento

Para purificação da reação de sequenciamento, 80 μ L de isopropanol 65% foram adicionados e homogeneizados, seguido por incubação a TA, no escuro, por 15 minutos e centrifugação a 3.200 g por 45 minutos, à TA. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado, 150 μ L de etanol 60% foram adicionados. Centrifugou-se a 3.200 g por 15 minutos, à TA, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco à TA por uma hora (no escuro).

Antes de serem aplicadas no sequenciador automático *ABI 3100* (*Applied Biosystems*), as amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formamida *Hi-Di* e desnaturadas a 95°C por cinco minutos.

3.10 Análise das Sequências das ESTs Obtidas

3.10.1 Análise de qualidade e agrupamento das seqüências

As ESTs obtidas tiveram suas bases analisadas quanto à qualidade, por meio do programa PHRED (EWING; GREEN, 1998). Sequências de bases correspondentes a seqüências do vetor pSPORT1, *E. coli* ou constituintes da cauda poli(A), foram mascaradas, utilizando-se o programa Cross_Match (GREEN, 1993).

Foram consideradas válidas, as ESTs que apresentaram no mínimo 150 pb com qualidade PHRED maior que 20. Estas foram agrupadas de acordo com a similaridade de suas seqüências nucleotídicas, por meio do programa Cap3 (HUANG; MADAN, 1999), empregando-se os

parâmetros padrões de sobreposição das seqüências (no mínimo 30 bases sobrepostas com pelo menos 75% de identidade).

Para a nomeação das ESTs foram levados em consideração os seguintes aspectos:

- Organismo estudado: *Gallus gallus*, GG;
- Sigla de identificação do Laboratório de Biotecnologia Animal: EZ;
- Biblioteca: HC1 para a biblioteca construída a partir da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC e HT1 para aquela das aves TT;
- Número da placa estoque: de 001 a 027;
- Letra da linha em que a EST está localizada na placa estoque: de A a H;
- Número da coluna em que a EST está localizada na placa estoque: de 01 a 12;
- Identificação da extremidade do inserto seqüenciada: extremidade 5', .g;
- Exemplo: GGEZHC1005A09.g.

As seqüências referentes à biblioteca HC1 foram depositadas no GenBank e receberam os números de acesso de CO419474 a CO421626 e aquelas referentes à HT1 de CO421627 a CO423759.

3.10.2 Identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) linhagem específicos

Foram considerados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) linhagem específicos, os polimorfismos que apareceram pelo menos duas vezes na mesma linhagem/posição e que apresentaram qualidade PHRED igual ou maior que 20.

Estes SNPs foram classificados de acordo com o tipo de substituição de suas bases em:

- Transição: mutação de uma purina para outra purina (A <-> G) ou de uma pirimidina para outra pirimidina (C <-> T).
- Transversão: mutação de uma purina para uma pirimidina (A/G -> C/T) ou vice-versa (C/T -> A/G).

3.10.3 Identidade das ESTs

As ESTs obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco público de seqüências do *GenBank* por meio do algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al, 1990).

As comparações foram realizadas, utilizando-se o programa BlastX contra o banco não redundante (nr), e BlastN contra os bancos de EST e de seqüências humanas, sendo que os parâmetros padrões foram empregados ($E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$, $\text{Score} \geq 100$ para BlastN e ≥ 200 para BlastX).

Outra comparação, baseada na montagem por meio do Cap3 e realização de BlastN das seqüências de ambas as bibliotecas com os consensos tentativos (*Tentative Consensus*, TCs) das ESTs da galinha, disponíveis no *site* do TIGR (The Institute for Genomic Research) foi realizada.

As ESTs que não tiveram sua identidade descoberta, ou seja, que não apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value}$ maior que 1.0×10^{-5}) com as seqüências dos bancos consultados e/ou não montaram com os TCs, foram comparadas (BlastN) com o genoma da galinha disponível no site do Ensembl e analisadas quanto a presença de fases de leitura aberta (*Open reading frames*, ORFs), utilizando-se a ferramenta *ORF finder* do GenBank.

3.10.4 Classificação das ESTs de acordo com as categorias do *Gene Ontology* (GO)

As ESTs obtidas foram montadas (Cap3) com as ESTs de galinha disponíveis no *site* do TIGR. A classificação nas ontologias: componente celular, processo biológico e função molecular do GO, e seus respectivos termos, dos TCs que apresentaram-se similares às ESTs, foram automaticamente adotadas.

3.10.5 Padrão de expressão digital (*digital expression profile*)

O padrão de expressão digital das ESTs foi obtido de acordo com a frequência relativa destas entre as duas bibliotecas. Foram considerados diferencialmente expressos, os genes cujas ESTs correspondentes apresentaram-se três vezes mais abundantes numa biblioteca em relação à outra, ou cuja diferença subtrativa foi maior que dois, quando o produto gênico correspondente apresentou-se ausente na outra biblioteca. Para estes, foi calculado os intervalos de confiança referentes aos níveis de significância arbitrários e tamanho das amostras (número de ESTs obtidas em cada biblioteca), por meio do programa desenvolvido por Audic e Claverie (1997).

Todos os resultados podem ser acessados na página do laboratório: <https://e5000.fapesp.br/pipeline/GG>.

3.11 Obtenção das Sondas e Impressão das Membranas

3.11.1 Escolha dos clones a serem impressos

Para construção das membranas, foram utilizadas como sondas, 144 ESTs que não tiveram suas identidades reveladas (Tabela 4) e como controle, seqüências referentes aos genes constitutivos β -actina e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Tabela 4 - Relação das ESTs utilizadas para construção das sondas, bem como suas posições na placa de impressão e nas membranas

(continua)

Clone	Placa	Posição: Coluna	Posição: Linha	Posição na membrana
GGEZHC1001D09.g	01	01	A	L1/L2/L3 - C1
GGEZHC1001H04.g	01	01	B	L4/L5/L6 - C1
GGEZHC1002D03.g	01	01	C	L7/L8/L9 - C1
GGEZHC1003F09.g	01	01	D	L10/L11/L12 - C1
GGEZHC1003H08.g	01	01	E	L13/L14/L15 - C1
GGEZHC1004D06.g	01	01	F	L16/L17/L18 - C1
GGEZHC1004D08.g	01	01	G	L19/L20/L21 - C1
GGEZHC1004E01.g	01	01	H	L22/L23/L24 - C1
GGEZHC1004F03.g	01	02	A	L1/L2/L3 - C4
GGEZHC1004F06.g	01	02	B	L4/L5/L6 - C4
GGEZHC1004H01.g	01	02	C	L7/L8/L9 - C4
GGEZHC1005A11.g	01	02	D	L10/L11/L12 - C4
GGEZHC1005C09.g	01	02	E	L13/L14/L15 - C4
GGEZHC1005D02.g	01	02	F	L16/L17/L18 - C4
GGEZHC1006B01.g	01	02	G	L19/L20/L21 - C4
GGEZHC1006B09.g	01	02	H	L22/L23/L24 - C4
GGEZHC1006G03.g	01	03	A	L1/L2/L3 - C7
GGEZHC1007B08.g	01	03	B	L4/L5/L6 - C7
GGEZHC1007E05.g	01	03	C	L7/L8/L9 - C7
GGEZHC1008G07.g	01	03	D	L10/L11/L12 - C7
GGEZHC1009B02.g	01	03	E	L13/L14/L15 - C7
GGEZHC1010E09.g	01	03	F	L16/L17/L18 - C7
GGEZHC1010F03.g	01	03	G	L19/L20/L21 - C7
GGEZHC1011F01.g	01	03	H	L22/L23/L24 - C7
GGEZHC1011G05.g	01	04	A	L1/L2/L3 - C10
GGEZHC1012B09.g	01	04	B	L4/L5/L6 - C10
GGEZHC1012B11.g	01	04	C	L7/L8/L9 - C10
GGEZHC1012G11.g	01	04	D	L10/L11/L12 - C10
GGEZHC1013C08.g	01	04	E	L13/L14/L15 - C10
GGEZHC1013D08.g	01	04	F	L16/L17/L18 - C10
GGEZHC1013D09.g	01	04	G	L19/L20/L21 - C10
GGEZHC1014D08.g	01	04	H	L22/L23/L24 - C10

Tabela 4 - Relação das ESTs utilizadas para construção das sondas, bem como suas posições na placa de impressão e nas membranas

(continuação)				
Clone	Placa	Posição: Coluna	Posição: Linha	Posição na membrana
GGEZHC1014E10.g	01	05	A	L1/L2/L3 – C13
GGEZHC1014F02.g	01	05	B	L4/L5/L6 – C13
GGEZHC1015C10.g	01	05	C	L7/L8/L9 – C13
GGEZHC1015C12.g	01	05	D	L10/L11/L12 – C13
GGEZHC1015F08.g	01	05	E	L13/L14/L15 – C13
GGEZHC1016A08.g	01	05	F	L16/L17/L18 – C13
GGEZHC1016H07.g	01	05	G	L19/L20/L21- C13
GGEZHC1016H08.g	01	05	H	L22/L23/L24 – C13
GGEZHC1017A04.g	01	06	A	L1/L2/L3 – C16
GGEZHC1017D02.g	01	06	B	L4/L5/L6 – C16
GGEZHC1017F03.g	01	06	C	L7/L8/L9 – C16
GGEZHC1018B01.g	01	06	D	L10/L11/L12 – C16
GGEZHC1018C11.g	01	06	E	L13/L14/L15 – C16
GGEZHC1018D07.g	01	06	F	L16/L17/L18 – C16
GGEZHC1018E01.g	01	06	G	L19/L20/L21- C16
GGEZHC1019A01.g	01	06	H	L22/L23/L24 – C16
GGEZHC1019A04.g	01	07	A	L1/L2/L3 – C19
GGEZHC1019C09.g	01	07	B	L4/L5/L6 – C19
GGEZHC1019F06.g	01	07	C	L7/L8/L9 – C19
GGEZHC1019G03.g	01	07	D	L10/L11/L12 – C19
GGEZHC1020B07.g	01	07	E	L13/L14/L15 – C19
GGEZHC1020C01.g	01	07	F	L16/L17/L18 – C19
GGEZHC1020D02.g	01	07	G	L19/L20/L21- C19
GGEZHC1020F06.g	01	07	H	L22/L23/L24 – C19
GGEZHC1020G09.g	01	08	A	L1/L2/L3 – C22
GGEZHC1021B02.g	01	08	B	L4/L5/L6 – C22
GGEZHC1021B03.g	01	08	C	L7/L8/L9 – C22
GGEZHC1021C07.g	01	08	D	L10/L11/L12 – C22
GGEZHC1021D09.g	01	08	E	L13/L14/L15 – C22
GGEZHC1021F11.g	01	08	F	L16/L17/L18 – C22
GGEZHC1021G10.g	01	08	G	L19/L20/L21- C22
GGEZHC1022C08.g	01	08	H	L22/L23/L24 – C22
GGEZHC1022D10.g	01	09	A	L1/L2/L3 – C25
GGEZHC1022H02.g	01	09	B	L4/L5/L6 – C25
GGEZHC1023B07.g	01	09	C	L7/L8/L9 – C25
GGEZHC1023D05.g	01	09	D	L10/L11/L12 – C25
GGEZHC1023D10.g	01	09	E	L13/L14/L15 – C25
GGEZHC1023G08.g	01	09	F	L16/L17/L18 – C25
GGEZHC1023G12.g	01	09	G	L19/L20/L21- C25
GGEZHC1023H05.g	01	09	H	L22/L23/L24 – C25
GGEZHC1023H08.g	01	10	A	L1/L2/L3 – C28
GGEZHC1024B07.g	01	10	B	L4/L5/L6 – C28
GGEZHC1024E08.g	01	10	C	L7/L8/L9 – C28
GGEZHC1024F10.g	01	10	D	L10/L11/L12 – C28
GGEZHC1025B09.g	01	10	E	L13/L14/L15 – C28

Tabela 4 - Relação das ESTs utilizadas para construção das sondas, bem como suas posições na placa de impressão e nas membranas

(continuação)				
Clone	Placa	Posição: Coluna	Posição: Linha	Posição na membrana
GGEZHC1025C02.g	01	10	F	L16/L17/L18 – C28
GGEZHC1025D06.g	01	10	G	L19/L20/L21- C28
GGEZHC1025D09.g	01	10	H	L22/L23/L24 – C28
GGEZHC1025G07.g	01	11	A	L1/L2/L3 – C31
GGEZHC1025H09.g	01	11	B	L4/L5/L6 – C31
GGEZHC1026B07.g	01	11	C	L7/L8/L9 – C31
GGEZHC1026G07.g	01	11	D	L10/L11/L12 – C31
GGEZHC1027B04.g	01	11	E	L13/L14/L15 – C31
GGEZHT1001G12.g	01	11	F	L16/L17/L18 – C31
GGEZHT1001H02.g	01	11	G	L19/L20/L21- C31
GGEZHT1002B12.g	01	11	H	L22/L23/L24 – C31
GGEZHT1002C12.g	01	12	A	L1/L2/L3 – C34
GGEZHT1003C05.g	01	12	B	L4/L5/L6 – C34
GGEZHT1003D10.g	01	12	C	L7/L8/L9 – C34
GGEZHT1004A04.g	01	12	D	L10/L11/L12 – C34
GGEZHT1004A10.g	01	12	E	L13/L14/L15 – C34
GGEZHT1004B05.g	01	12	F	L16/L17/L18 – C34
GGEZHT1004C02.g	01	12	G	L19/L20/L21- C34
GGEZHT1004D05.g	01	12	H	L22/L23/L24 – C34
GGEZHT1005B07.g	02	01	A	L1/L2/L3 – C2
GGEZHT1005E04.g	02	01	B	L4/L5/L6 – C2
GGEZHT1005F01.g	02	01	C	L7/L8/L9 – C2
GGEZHT1005G06.g	02	01	D	L10/L11/L12 – C2
GGEZHT1006A12.g	02	01	E	L13/L14/L15 – C2
GGEZHT1006C03.g	02	01	F	L16/L17/L18 – C2
GGEZHT1006E09.g	02	01	G	L19/L20/L21- C2
GGEZHT1006H03.g	02	01	H	L22/L23/L24 – C2
GGEZHT1007B10.g	02	03	A	L1/L2/L3 – C8
GGEZHT1007E04.g	02	03	B	L4/L5/L6 – C8
GGEZHT1007F10.g	02	03	C	L7/L8/L9 – C8
GGEZHT1008C11.g	02	03	D	L10/L11/L12 – C8
GGEZHT1008D07.g	02	03	E	L13/L14/L15 – C8
GGEZHT1009F05.g	02	03	F	L16/L17/L18 – C8
GGEZHT1010H07.g	02	03	G	L19/L20/L21- C8
GGEZHT1011F08.g	02	03	H	L22/L23/L24 – C8
GGEZHT1012D06.g	02	05	A	L1/L2/L3 – C14
GGEZHT1013A01.g	02	05	B	L4/L5/L6 – C14
GGEZHT1013D11.g	02	05	C	L7/L8/L9 – C14
GGEZHT1013G08.g	02	05	D	L10/L11/L12 – C14
GGEZHT1014A08.g	02	05	E	L13/L14/L15 – C14
GGEZHT1014B04.g	02	05	F	L16/L17/L18 – C14
GGEZHT1014C05.g	02	05	G	L19/L20/L21- C14
GGEZHT1015C05.g	02	05	H	L22/L23/L24 – C14
GGEZHT1016A07.g	02	07	A	L1/L2/L3 – C20
GGEZHT1016B07.g	02	07	B	L4/L5/L6 – C20

Tabela 4 - Relação das ESTs utilizadas para construção das sondas, bem como suas posições na placa de impressão e nas membranas

(conclusão)				
Clone	Placa	Posição: Coluna	Posição: Linha	Posição na membrana
GGEZHT1016C11.g	02	07	C	L7/L8/L9 – C20
GGEZHT1016G12.g	02	07	D	L10/L11/L12 – C20
GGEZHT1016H10.g	02	07	E	L13/L14/L15 – C20
GGEZHT1017A09.g	02	07	F	L16/L17/L18 – C20
GGEZHT1017C11.g	02	07	G	L19/L20/L21- C20
GGEZHT1017G08.g	02	07	H	L22/L23/L24 – C20
GGEZHT1017H02.g	02	09	A	L1/L2/L3 – C26
GGEZHT1017H12.g	02	09	B	L4/L5/L6 – C26
GGEZHT1018G11.g	02	09	C	L7/L8/L9 – C26
GGEZHT1019D06.g	02	09	D	L10/L11/L12 – C26
GGEZHT1019D08.g	02	09	E	L13/L14/L15 – C26
GGEZHT1020A01.g	02	09	F	L16/L17/L18 – C26
GGEZHT1020C07.g	02	09	G	L19/L20/L21- C26
GGEZHT1020D09.g	02	09	H	L22/L23/L24 – C26
GGEZHT1020F02.g	02	11	A	L1/L2/L3 – C32
GGEZHT1020F10.g	02	11	B	L4/L5/L6 – C32
GGEZHT1021B02.g	02	11	C	L7/L8/L9 – C32
GGEZHT1021G03.g	02	11	D	L10/L11/L12 – C32
GGEZHT1022A04.g	02	11	E	L13/L14/L15 – C32
GGEZHT1023E12.g	02	11	F	L16/L17/L18 – C32
GGEZHT1023G03.g	02	11	G	L19/L20/L21- C32
GGEZHT1024H10.g	02	11	H	L22/L23/L24 – C32
GAPDH				L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9 L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16 L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23 L24 – C5 L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9 L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16 L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23 L24 – C17 L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9 L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16 L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23 L24 – C29 L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9 L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16 L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23 L24 – C11 L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9 L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16 L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23 L24 – C23 L1/L2/L3/L4/L5/L6/L7/L8/L9 L10/L11/L12/L13/L14/L15/L16 L17/L18/L19/L20/L21/L22/L23 L24 – C35

L = Linha; C = Coluna

3.11.2 Replicação dos clones utilizados para a construção das sondas

Os clones das bibliotecas HT1 e HC1 e dos controles, mantidos em estoque com glicerol a -80°C , foram replicados em cultura fresca. Estes clones foram rearranjados em duas placas de 96, sendo que a placa de número 01 (um) foi constituída por 96 seqüências das bibliotecas HC1 e HT1 e a de número 02 (dois) compreendeu os demais clones (48 ESTs das bibliotecas HC1 e HT1) e 48 seqüências referentes aos controles – 24 referentes à β -actina e 24 referentes ao GAPDH – como demonstrado na figura 6. Para isto, 1 mL de meio *Circle Grow* com ampicilina ($1\text{ }\mu\text{L/mL}$) foi adicionado a cada poço de uma placa de replicação de 96 e as bactérias contendo os clones de interesse foram inoculadas com o auxílio de palitos de madeira esterilizados. As culturas foram mantidas sob agitação por 22 horas, a 37°C .

Figura 6 - Disposição dos clones referentes às bibliotecas HC1 e HT1 e dos controles, GAPDH e β -actina, nas duas placas de 96

3.11.3 Mini-preparação plasmidial dos clones

O DNA plasmidial dos clones foi isolado efetuando-se lise alcalina, como descrito no item 3.6.

3.11.4 Seqüenciamento dos clones

Os clones tiveram suas extremidades 5' re-seqüenciadas com o auxílio do equipamento automático ABI 3100, utilizando-se o *kit Big Dye* e primer T7, como mencionado no item 3.8.

3.11.5 PCR da mini-prep dos clones

Para obtenção de resultados mais específicos, os produtos de PCR das mini-preps dos clones foram impressos nas membranas. Para isto, foram adicionados a 1 µL (100 – 200 ng) de DNA:

Tampão 10X *	10,0 µL
MgCl ₂ (50 mM)	3,0 µL
Solução de dNTPs (100 mM)	2,0 µL
Primer M13 direto (5 pmol/µL) **	4,0 µL
Primer M13 reverso (5 pmol/µL) ***	4,0 µL
Água Milli-Q estéril	74,4 µL
Enzima Taq DNA polimerase	1,6 µL

* 10mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl e 0,1% Triton X-100

** 5'- GTAAAACGACGGCCAGT- 3'

*** 5'- AACAGCTATGACCATG- 3'

As condições de tempo e temperatura empregadas nesta reação foram:

Temperatura	Tempo	Nº repetições
95°C	3 minutos	1
95°C	30 segundos	
60°C	45 segundos	
72°C	3 minutos	
72°C	5 minutos	1
4°C	∞	

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos insertos amplificados.

3.11.6 Precipitação do produto de PCR

Os produtos de PCR (100 μ L) foram precipitados, adicionando-se 5 μ L de acetato de potássio 3 M e 150 μ L de etanol 95%. Após homogeneização, as placas foram incubadas a -80°C por 1 hora e centrifugadas a 1.300 g por 1 hora, a 4°C . Após descarte do sobrenadante, 150 μ L de etanol 70% foram adicionados. As placas foram novamente centrifugadas a 1.300 g por 1 hora, a 4°C e, após descarte do sobrenadante, foram secas à TA, por aproximadamente 1 hora.

O precipitado foi ressuspensionado em 25 μ L de água Milli-Q estéril e o produto de PCR, então purificado, foi quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm, considerando que uma unidade de OD₂₆₀ seja equivalente a 50 $\mu\text{g/mL}$. Os produtos de PCR foram diluídos, adicionando-se a quantidade de água Milli-Q estéril necessária para concentração final de 200 ng/ μ L.

3.11.7 Preparo da solução de impressão

Para impressão, foram adicionados 7,5 μ L de NaOH 0,4 M a 7,5 μ L de cada produto de PCR (200 ng/ μ L), obtendo-se concentração final de 100 ng/ μ L de DNA e 0,2 M de NaOH. Após homogeneização, esta solução foi aquecida a 37°C , por 15 minutos, para desnaturação do DNA.

3.11.8 Impressão das membranas

Vinte membranas de náilon *Hybond⁺* (Invitrogen) foram cortadas nas dimensões de 13 X 7 cm e impressas de forma idêntica (réplicas), com o auxílio do transferidor manual *VP Scientific* de 96 *pins*. As sondas foram impressas 3 (três) vezes em cada *spot* (ponto) e em triplicata, num arranjo 3 X 2, de acordo com as posições descritas na tabela 4, e representado na figura 7, sendo que “L” ou “R” refere-se à linha e “C” à coluna em que os clones encontram-se nas membranas.

Após impressão, o DNA desnaturado foi fixado às membranas, expondo-as a 70 mJ/segundo de radiação ultravioleta (UV). As membranas foram armazenadas em local seco, entre folhas de papel filtro de 3 mm, até serem utilizadas.

Figura 7 - Representação da impressão das membranas (pontos pretos referem-se ao gene controle GAPDH e pontos cinzas ao gene controle β -actina)

3.12 Síntese e Hibridização das Membranas com a Sonda Plasmidial (Overgo)

3.12.1 Síntese do *primer* Overgo

A sonda plasmidial foi construída com base na região complementar à região de anelamento do *primer* SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3' - Figura 8), uma vez que na reação de PCR para a construção das sondas, foram utilizados os *primers* M13 direto (D) e reverso (R). Sendo assim, uma sequência de 18 bases foi construída de forma que houvesse complementariedade de 8 bases entre os *primers*: SP6 e Overgo (3' GTGATATCTTCTCGATAC 5').

1. Região de inserção do produto de PCR

CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGAATTTAGGTGACACT
 ATAGAAGAGCTATGACGTCGCATGCACGCGTACGTAAGCTTGGATCCTCTAGA
 GCGGCCGCC **inseto de cDNA** CGGACGCGTGGGTCGACCCGGAATTCCGGAC
 CGGTACCTGCAGGCGTACCAGCTTTCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGGC
 GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT

2. Regiões de alinhamento de primers

(M13 – D) 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'
 CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGAATTTAGGTGACACT
 (SP6) 5' ATTTAGGTGACACT

ATAGAAGAGCTATGACGTCGCATGCACGCGTACGTAAGCTTGGATCCTCTAGA
 ATAG 3'

GCGGCCGCC **inseto de cDNA** CGGACGCGTGGGTCGACCCGGAATTCCGGAC
 CGGTACCTGCAGGCGTACCAGCTTTCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGGC
 3' GGGATATCACTCAGCATAAT 5' (T7)

GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
 3' GTACCAGTATCGACAA 5' (M13 – R)

3. Primer Overgo construído com base na região referente ao primer SP6

5' ATTTAGGTGACACTATAG 3' (Sp6)
 3' GTGATATCTTCTCGATAC 5' (Overgo)

Figura 8 - Regiões, do pSPORT1, de inserção dos produtos de PCR e de anelamento dos *primers*, utilizadas para construção do *primer* Overgo

3.12.2 Reação de síntese da sonda plasmidial

Para a síntese da sonda plasmidial, fez-se uma solução de 10 pmol/μL com os primers SP6 e Overgo. Esta solução foi aquecida a 80°C por 5 minutos, para desnaturação, e em seguida a

37°C, por 10 minutos, para anelamento da região complementar entre estes dois *primers*. Foram adicionados a 1 µL desta solução os reagentes listados abaixo e a reação foi efetuada a 37°C, por 1 hora.

Reagentes utilizados na reação de síntese da sonda plasmidial:

BSA (2 mg/mL)	0,5 µL
OLB *	2,0 µL
[α - ³³ P] dCTP (10 µCi/µL)	0,5 µL
Fragmento 1 da DNA Polimerase (2 U/µL)	1,0 µL
<i>Primer</i> M13 reverso (5 pmol/µL)	4,0 µL
Água Milli-Q estéril	5,0 µL

* Solução OLB: Soluções A:B:C = 1:2,5:1,5

Solução O: 1,25 M Tris – HCl pH 8,0 e 125 mM de MgCl₂

<u>Solução A:</u>	Solução O	66,6 µL
	β-mercaptoetanol	1,2 µL
	Mix dATG 100 mM	1,0 µL

Solução B: HEPES – NaOH 2 M pH 6,6

Solução C: 3 mM de Tris – HCl pH 7,4 e 0,2 mM de EDTA

A sonda foi então purificado em coluna G-50 (*GE Healthcare – Amersham Biosciences*) e desnaturada a 90°C por 10 minutos.

3.12.3 Hibridização das membranas com a sonda plasmidial

Para quantificar o DNA impresso em cada *spot*, todas as membranas foram hibridizadas com a sonda plasmidial. Primeiramente, cada membrana foi pré-hibridizada, durante 4 horas a 50°C, com uma solução contendo:

SSC 20 X	2,5 mL
Tris – HCl 1 m , pH 7,5	0,2 mL
Formamida deionizada	5,0 mL
Denhardt's 50 X	2,0 mL
SDS 10%	1,0 mL
Água Milli-Q estéril	0,2 mL
DNA de esperma de salmão desnaturado	0,1 mL

A solução de pré-hibridização foi substituída pela de hibridização (reagentes listados abaixo) e, após adição da sonda plasmidial, a hibridização foi efetuada por 18 horas a 50°C.

Reagentes da Solução de Hibridização:

SSC 20 X	2,5 mL
Tris – HCl 1 M, pH 7,5	0,2 mL
Formamida deionizada	5,0 mL
Denhardt's 50 X	0,4 mL
SDS 10%	1,0 mL
Dextran 50%	1,0 mL
DNA de esperma de salmão desnaturado	0,1 mL

As membranas foram lavadas duas vezes com SSC 2 X e SDS 0,1%, por 15 minutos cada lavagem, a TA, depois mais duas vezes com SSC 1,5 X e SDS 0,1%, por 15 minutos cada lavagem, a 50°C e finalmente duas vezes com SSC 0,5 X e SDS 0,1%, por 15 minutos cada lavagem, a 50°C.

3.12.4 Exposição das membranas e Revelação do IP

Após lavagem, as membranas foram colocadas entre folhas de plástico, acomodadas em cassete (*Invitrogen*) e expostas por 48 horas em *Imaging Plate* (IP, *Kodak*). Após este período, os IPs foram revelados por meio do equipamento *STORM® PhosphorImager* (*GE Healthcare – Amersham Biosciences*) e as imagens obtidas foram digitalizadas utilizando-se o *software ImageQuant* (*GE Healthcare – Amersham Biosciences*).

3.12.5 Lavagem final das membranas (*Stripping*)

Para retirada da sonda plasmidial, as membranas foram submetidas a duas lavagens com SDS 0,1% fervente, sendo que as membranas foram mantidas submersas nesta solução por 15 minutos, sob agitação a 58°C em cada lavagem.

As membranas embebidas na solução de lavagem foram armazenadas entre folhas de plástico a -20°C até serem utilizadas para hibridização com os alvos.

3.13 Preparo dos Alvos

3.13.1 Coleta dos tecidos e extração de RNA total

Os alvos foram construídos a partir de 5 (cinco) diferentes tecidos, coletados de frangos de uma linhagem comercial de corte de 21 dias de idade: hipófise, hipotálamo, cérebro, musculatura peitoral e fígado. Os tecidos coletados foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até serem utilizados para a extração do RNA total como descrito no item 3.3.

3.13.2 Construção dos alvos

Os alvos foram construídos, realizando-se a síntese de cDNA na presença de bases marcadas com fósforo 33 ([α -³³P] dCTP a 1 μ Ci/ μ L), a partir do RNA total de um *pool* de 3 (três) animais por alvo. Foram construídos 3 (três) *pools* de cada tecido, contendo RNA de 3 (três) animais cada (total de nove animais para cada tecido).

Após verificação da qualidade e quantificação do RNA, a 30 μ g de RNA de cada alvo (10 μ g de cada animal), contido em aproximadamente 20 μ L, foi adicionado 1,5 μ L de Oligo dT₁₈ a 100 μ M. Após aquecimento a 75°C, por 10 minutos, para anelamento deste com a extremidade 3' dos insertos (Poli-A), os seguintes reagentes foram adicionados:

5X tampão da primeira fita*	5,0 μ L
DTT (100 mM)	2,5 μ L
dNTP, exceto dCTP (10 mM cada)	2,5 μ L
[α - ³³ P] dCTP (10 μ Ci/ μ L)	5,0 μ L

* 250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂

Após aquecimento da solução a 42°C, por 5 (cinco) minutos, 1,25 μ L da enzima Superscript III a 200 U/ μ L (*Invitrogen*) foram adicionados. A reação foi mantida por 20 minutos a 42°C, 1,25 μ L de dCTP (10 mM) foram adicionados, e a reação foi então completada a 42°C por 1 (uma) hora. Adicionou-se 1 μ L de Poli-A (2 μ g/ μ L) e desnaturou-se a sonda a 94°C, por 5

minutos. Após o acréscimo de 1,4 µL de NaOH 5 M e incubação por 15 minutos, a 37°C, 1,8 µL de HCl 4 M e 7 µL de Tris-HCl 1 M pH 7,5 foram adicionados.

As sondas foram então purificadas em colunas G-50 (Amersham).

3.13.3 Hibridização das membranas com os alvos

As membranas foram descongeladas e pré-hibridizadas com a mesma solução utilizada na pré-hibridização das membranas com a sonda plasmidial (item 3.12.3) por 2 horas, a 42°C, no intuito de diminuir a interferência de fundo (*background*). Esta solução foi substituída pela solução de hibridização (item 3.12.3) contendo cada alvo desnaturado e mantida a 42°C, por 18 horas. As membranas foram então lavadas duas vezes com as soluções, cujos respectivos tempos e temperaturas encontram-se descritos abaixo:

<u>Solução</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>
SSC 2 X; SDS 0,1%	TA	15 minutos
SSC 1,5 X; SDS 0,1%	58°C	15 minutos
SSC 0,5 X; SDS 0,1%	58°C	15 minutos

3.13.4 Exposição das membranas e Revelação do IP

A exposição das membranas e revelação dos IPs foi efetuada como descrito no item 3.12.4, porém as membranas foram expostas por 4 dias, e não por 48 horas como foi realizado com a sonda plasmidial.

3.13.5 Lavagem final das membranas (*Striping*)

Para retirada dos alvos e posterior reutilização das membranas em hibridização com outros alvos, estas foram lavadas duas vezes com cada solução, nos respectivos tempos e temperaturas:

<u>Solução</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>
NaOH 0,4 N; SDS 01%	65°C	15 minutos
Tris 0,2 N; SDS 0,1%; SSC 0,1 X, pH 7,0	65°C	15 minutos

As membranas, embebidas nesta solução, foram armazenadas entre folhas de plástico a -20°C até serem reutilizadas.

3.14 Quantificação da Expressão dos Genes e Análise Estatística

3.14.1 Quantificação e normalização do sinal dos *spots*

Para a obtenção do resultado de expressão dos genes correspondentes aos produtos de PCR impressos, as imagens obtidas foram analisadas por meio do *software ArrayVision* versão 8.0 (*Imaging Research Inc.*). O valor dos sinais de cada *spot* foi corrigido pelo resíduo de fundo (nVOL) e utilizado para a normalização das membranas.

A primeira normalização foi efetuada com base nos sinais obtidos após hibridização das membranas com a sonda plasmidial (OVERGO). Para isto, o valor de intensidade de cada *spot*, resultante da hibridização com os diferentes alvos, foi dividido pelo valor do mesmo *spot* resultante da hibridização com o OVERGO. Esta normalização serviu para corrigir possíveis diferenças na quantidade de material impresso nas membranas.

Uma segunda normalização foi efetuada com base nos sinais do gene constitutivo GAPDH, uma vez que este se apresentou mais constante nas diferentes hibridizações em relação à β -actina e, desta forma, foi utilizado como controle positivo. Sendo assim, calculou-se o valor médio dos sinais de GAPDH de cada membrana/hibridização e dividiu-se o valor normalizado de cada *spot* por este.

O valor final obtido de cada *spot* foi, então, transformado em $\log_2$ e utilizado no modelo estatístico.

3.14.2 Análise estatística

Os dados foram analisados empregando-se um modelo misto em dois estágios (WOLFINGER et al, 2001). No primeiro estágio, foi ajustado o modelo de normalização dos dados:

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

Sendo que:

y_{ijklm} é logaritmo na base dois da intensidade de sinal (valor de expressão gênica); μ é uma constante associada a cada observação; G_i é o efeito do gene i ($i = 1, \dots, 144$); T_j é o efeito do tratamento (tecido) j ($j = 1, \dots, 5$); M_k é o efeito aleatório da membrana k ($k = 1, \dots, 16$); $Q_{(k)l}$ é o efeito do quadrante l ($l = 1, \dots, 96$) dentro da membrana k e r_{ijklm} é o erro aleatório associado a cada observação. O efeito $Q_{(k)l}$ foi incluído para permitir o ajuste para efeito espacial na membrana.

Neste modelo, assume-se que M_k , $Q_{(k)l}$ e r_{ijklm} são $N(0, \sigma_k^2)$, $N(0, \sigma_Q^2)$, $N(0, \sigma_r^2)$ respectivamente, e que todos são independentes um do outro.

Numa segunda etapa, um modelo de efeito gene-específico foi ajustado, a partir dos resíduos obtidos pelo ajuste do modelo de normalização:

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

Sendo que:

r_{gijk} 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} é o erro aleatório associado a cada observação.

Neste modelo, assume-se que $M_{(gi)j}$ e e_{gijk} são $N(0, \sigma_Q^2)$, $N(0, \sigma_e^2)$ respectivamente, e independentes um do outro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de RNA Total e Isolamento do mRNA

Para verificação da integridade do RNA total extraído da hipófise e hipotálamo das aves CC e TT, 1 μL do *pool* de cada linhagem foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas presentes na figura 9, correspondentes às subunidades estruturais 28 S e 18 S do RNA ribossômico (rRNA), indicam que o RNA total extraído de ambas as linhagens não sofreu ação de RNases, podendo, desta forma, ser utilizado para o isolamento do mRNA.

Figura 9 - Fotografia do gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total extraído da hipófise e hipotálamo das aves CC (primeira fileira) e TT (segunda fileira). Cada canaleta contém 1 μL do RNA total extraído e 3 μL de bromofenol, corados com brometo de etídio

O RNA total extraído foi quantificado e 500 μg da amostra de cada linhagem foram utilizados para o isolamento do mRNA, utilizando-se o *kit Oligotex*. Para certificação do sucesso do processo de isolamento, 1 μL do mRNA isolado foi aplicado em gel de agarose 1% (Figura 10).

Figura 10 - Fotografias dos géis de agarose 1% para verificação da qualidade do mRNA isolado a partir da população de RNA total, extraída da hipófise e hipotálamo das aves das linhagens CC (A) e TT (B)

4.2 Construção das Bibliotecas de cDNA

Para a construção das duas bibliotecas de cDNA (biblioteca HC1 - hipófise e hipotálamo das aves CC - e HT1 - hipófise e hipotálamo das aves TT), o mRNA contido em 500 µg de RNA total foi utilizado como molde para a síntese do cDNA dupla fita.

Para seleção dos maiores fragmentos, separados por meio de coluna cromatográfica, e obtenção de quantidade suficiente de cDNA para realização da ligação (cerca de 10 µg/µL), 5 µL das amostras contidas nas frações de 07 a 20 da biblioteca TT e de 07 a 18 da CC, foram aplicados em gel de agarose 1% e revelados, após transferência para membrana. A figura 11 demonstra a distribuição do tamanho destes fragmentos entre as frações de ambas as bibliotecas, sendo que as amostras utilizadas para ligação, e posterior transformação, foram as contidas nas frações 07, 08 e 09 da biblioteca HT1 e 07 e 08 da HC1.

Figura 11 - Revelação das membranas para verificação da distribuição do tamanho dos fragmentos de cDNA entre os tubos da biblioteca HC1 (A) e HT1 (B). Foram utilizadas para ligação e transformação, as amostras contidas nos tubos 7 e 8 da biblioteca HC1 e 7, 8 e 9 da HT1

4.3 Mini-preparação Plasmidial

Após ligação do cDNA ao plasmídeo pSPORT1, 2 μ L do produto final da ligação de cada biblioteca foram utilizados para transformação em bactéria eletrocompetente *E. coli* DH10B. O DNA plasmidial foi extraído, por meio de lise alcalina, para posterior realização do sequenciamento. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas em gel de agarose 1%, comparando-se o padrão de bandas obtido com o padrão de peso molecular pGEM4Z (40 ng/ μ L), como exemplificado na figura 12.

Figura 12 - Fotografia do gel de agarose 1% para verificação da qualidade e estimativa da concentração do DNA plasmidial extraído das bibliotecas HC1 e HT1, em relação ao padrão de peso molecular pGEM4Z (40 ng/μL)

Constatou-se que o DNA plasmidial extraído da biblioteca HC1 estava concentrado a aproximadamente 100 ng/μL e da HT1 a aproximadamente 200 ng/μL.

4.4 PCR da Mini-preparação do DNA Plasmidial

Para verificação do tamanho dos insertos de cDNA clonados, meia placa (48 clones) de cada biblioteca foi submetida a uma reação de PCR, utilizando-se os primers M13 direto e reverso. O padrão de peso molecular 1 kb DNA *ladder* (GIBCO/BRL) foi utilizado na estimativa do tamanho dos produtos de PCR, por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, como demonstrado nas figuras 13 e 14.

Figura 13 - Fotografia do gel de agarose 1%, para verificação do tamanho dos produtos de PCR da mini-prep da biblioteca HC1. As canaletas 1 e 26 correspondem ao marcador molecular 1 kb DNA *Ladder* (GIBCO/BRL)

Figura 14 - Fotografia do gel de agarose 1%, para verificação do tamanho dos produtos de PCR da mini-prep da biblioteca HT1. As canaletas 1 e 26 correspondem ao marcador molecular 1 kb DNA *Ladder* (GIBCO/BRL)

A maior parte dos insertos estava compreendida na faixa de 1.000 pb ou mais, indicando que plasmídios contendo insertos grandes de cDNA foram transformados e clonados de maneira satisfatória.

4.5 Sequenciamento, Análise de qualidade e Montagem das Sequências da Bibliotecas HC1 e HT1

Após validação, 2.521 clones da biblioteca HC1 e 2.496 da HT1 foram sequenciados, resultando em 5.017 ESTs.

Estas sequências foram submetidas a análise de qualidade de suas bases (*base calling*), efetuada por meio do programa PHRED e mascaramento (*trimming*) das sequências de bases relacionadas a sequências do vetor, *E. coli* ou poli(A), por meio do programa *Cross_Match*. Foi obtido um total de 4.286 sequências com no mínimo 150 pb e qualidade PHRED maior que 20, correspondendo a 2.153 ESTs da biblioteca HC1 e 2.133 da HT1. Estes resultados indicam uma eficiência de sequenciamento (número de ESTs válidas/número total de ESTs sequenciadas) de 85,4% para a biblioteca HC1 e 85,5% para HT1 (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da análise individual e conjunta da qualidade das bases (*base calling*), montagem e mascaramento (*trimming*) das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1

	HC1	HT1	HC1/HT1
Total de ESTs sequenciadas	2.521	2.496	5.017
Total ESTs válidas	2.153	2.133	4.286
Número médio de bases/EST	946	873	910
Eficiência de sequenciamento (%)	85,4	85,5	85,4
Bases com qualidade PHRED > 20 (%)	59,1	66,3	62,7
Bases com qualidade PHRED > 30 (%)	51,1	57,2	54,2
ESTs contendo de 10 a 80% de bases de vetor (%)	8,6	8,8	8,7
ESTs contendo mais de 80% de bases de vetor (%)	1,9	5,8	7,7
Total de sequências únicas (<i>clusters</i>)	1.649	1.643	3.074
Total de <i>singletons</i>	1.475	1.477	2.685
Total de <i>contigs</i>	174	166	389
Total de ESTs dentro de <i>contigs</i>	678	656	1601
Índice de novidade (%)	76,6	77,0	71,7

A biblioteca HC1 apresentou 59,1% de bases com qualidade PHRED acima de 20 e 51,1% acima de 30, embora 8,6% tenha sido constituída por seqüências apresentando de 10 a 80% de bases de vetor e 1,9% por seqüências com mais de 80% de bases de vetor.

A biblioteca HT1 apresentou 66,3% de bases com qualidade PHRED acima de 20 e 57,2% acima de 30. Quanto à porcentagem de bases relacionadas a seqüências do vetor, 8,8% das seqüências desta biblioteca continham de 10 a 80% de bases de vetor e 5,8% compreendiam mais de 80% de vetor.

Após a montagem das seqüências da biblioteca HT1, por meio do programa Cap3, um total de 1.643 seqüências únicas (*clusters*) foi obtido. Estas seqüências foram compostas por 166 *contigs* - grupos de seqüências teoricamente relacionadas ao mesmo gene que apresentam similaridade entre si -, contendo 656 ESTs e 1.477 *singletons* - seqüências que apareceram uma única vez -, como demonstrado na figura 15. Esta montagem forneceu um índice de novidade, ou seja, o número de seqüências únicas dividido pelo número de ESTs válidas, de 77,0% (Tabela 5).

Figura 15 - Relação entre frequência e número de seqüências constituintes dos *clusters* da biblioteca HT1

No caso da biblioteca HC1, 1.649 seqüências únicas foram obtidas, sendo 174 *contigs*, contendo 678 ESTs e 1.475 *singletons* (Figura 16), o que corresponde a um índice de novidade de 76,6% (Tabela 5).

Figura 16 - Relação entre frequência e número de seqüências constituintes dos *clusters* da biblioteca HC1

As duas bibliotecas apresentaram uma distribuição semelhante de suas ESTs entre *contigs* e *singletons* e dentro dos *contigs*, o que pode ser explicado pelo número semelhante de ESTs seqüenciadas das bibliotecas.

A montagem das seqüências de ambas as bibliotecas também foi efetuada, empregando-se os mesmos parâmetros da montagem individual (Figura 17). Este procedimento resultou em 3.074 seqüências únicas, compreendendo 389 *contigs*, contendo 1.601 ESTs e 2.685 *singletons* (índice de novidade de 71,7%).

Figura 17 - Relação entre frequência e número de seqüências constituintes dos *clusters* resultantes da montagem conjunta das seqüências das bibliotecas HC1 e HT1

4.6 Análise da Identidade das ESTs

A identidade das ESTs (identificação do gene ao qual a EST está relacionada) foi investigada, efetuando-se primeiramente uma comparação, por meio do BlastX, contra o banco não redundante (nr), e BlastN contra o banco de EST, ambos disponíveis no site do *GenBank*. Efetuou-se, posteriormente, montagem e BlastN destas seqüências com os consensos tentativos (*tentative consensus*, TCs) das ESTs de galinha disponíveis no site do TIGR. Mesmo assim, 146 ESTs – 85 seqüências da biblioteca HC1 e 61 da HT1 – não puderam ter sua identidade determinada.

Para verificar se essas ESTs poderiam corresponder a seqüências desconhecidas ou não publicadas e descartar a possibilidade de serem artefatos de seqüenciamento, elas foram comparadas (BlastN) com as seqüências dos genomas humano (NCBI,) e da galinha (ENSEMBL,) e analisadas quanto à presença de fases de leitura aberta (ORFS,).

Das 146 ESTs sem identidade, 133 (91,1%) – 79 seqüências da biblioteca HC1 e 54 da HT1 – puderam ser localizadas no genoma da galinha. Um total de 54 ESTs alinhou em regiões diferentes, porém próximas, do genoma, indicando que estas ESTs podem ser produtos de *splicing*. Este resultado diminui a possibilidade destas seqüências serem referentes ao DNA

genômico, que poderia ter sido seqüenciado acidentalmente, uma vez que não são alinhadas de forma contínua e sim segmentada.

O alinhamento das 133 ESTs nos cromossomos constituintes do genoma da galinha está demonstrada na figura 18. Como pode ser visto, a maior parte das ESTs alinharam em regiões dos cromossomos 1 (25 ESTs, 18,8%) e 2 (25 ESTs, 18,8%). O cromosso 1 aloca genes importantes para a endocrinologia e reprodução tais como *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*), *CYP19* (*aromatase cytochrome P450*), cuja proteína cataliza a conversão do androgênio em estrogênio (LEPHART; LUND; HORVATH, 2001), *GH1* (*somatotropin 1*) e *PGR* (*progesterone receptor*). Já o cromossomo 2 abriga o *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) e *MYC* (*avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) e *YES1* (*Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*), os quais estão envolvidos no processo de proliferação e transformação celular, dentre outros.

Figura 18 - Número de alinhamento (BlastN) das 133 ESTs sem identidade no cromossomos que compreendem o genoma da galinha

Ao contrário do resultado do BlastN contra o genoma da galinha, apenas duas das 146 ESTs puderam ser alinhadas em regiões do genoma humano. A EST GGEZHC1010E09.g (758 pb) teve sua região de 15 pb a 149 pb alinhada em duas regiões diferentes do cromossomo 14 do genoma humano (região de 13942679 pb a 13942813 pb e de 15148579 pb a 15148713 pb), apresentando 93% de identidade. Já a região de 134 pb a 408 pb da EST GGEZHC1018C11.g (708 pb), alinhou nas regiões de 20532130 pb a 20531857 pb e de 54217613 pb a 54217340 pb do cromossomo 3 do genoma humano, com uma identidade de 89%.

Um total de 130 ESTs apresentou pelo menos uma fase de leitura aberta, ou seja, das 133 ESTs que puderam ser localizadas no genoma da galinha, apenas as ESTs GGEZHT1001H02.g, GGEZHC1020F06.g e GGEZHC1020C01.g não apresentaram ORFs. Este resultado sugere que estas 130 ESTs podem codificar proteínas.

Com isto, pode-se concluir que as 133 ESTs que alinharam em regiões do genoma da galinha podem corresponder a genes ou produtos gênicos ainda não identificados ou não publicados e que 130 destas são seqüências específicas de aves, uma vez que não puderam ser localizadas no genoma humano.

4.7 Caracterização das ESTs

O consórcio *Gene Ontology* (GO) é um conjunto de bancos de dados de organismos modelo, cujo objetivo é produzir um vocabulário estruturado, definido, comum e controlado para descrever os papéis dos genes e produtos gênicos de qualquer organismo. Este é constituído por três vocabulários controlados ou ontologias (ASHBURNER et al., 2000):

- Componente Celular: refere-se ao lugar da célula (meio intra- ou extra-celular) em que o produto gênico se encontra ativo;
- Função molecular: definido como a “atividade característica do produto gênico”;
- Processo biológico: consiste no fenômeno marcado por mudanças que levam a um resultado particular, mediado por um ou mais produtos gênicos em estudo.

Para classificação, as ESTs de ambas as linhagens foram montadas (Cap3) com os TCs das ESTs disponíveis no site do TIGR (www.tigr.org) e a anotação automática, de acordo com os termos do GO, do TC correspondente, foi adotada para cada seqüência.

Desta forma, 655 ESTs da biblioteca HT1 puderam ser engajadas no termo componente celular, 692 no termo processo biológico e 675 em função molecular. Quanto à biblioteca HC1, 517 ESTs puderam ser classificadas nos termos componente celular, 590 no termo processo biológico e 585 em função molecular.

A maior parte das seqüências da biblioteca HT1 que foram engajadas na ontologia componente celular, como listado na tabela 6, foi inserida no termo célula (626 ESTs; 95,6%), seguido por não localizado e componente celular desconhecido (56 ESTs em cada termo; 8,5%), extracelular (48 ESTs; 7,3%) e obsoleto (21 ESTs; 3,2%). Das que entraram na ontologia

processo biológico, 519 ESTs (75%) foram inseridas no termo processo fisiológico, 428 (61,8%) no termo processo celular e 239 (34,5%) no termo desenvolvimento. Já o termo mais freqüente da ontologia função molecular foi atividade catalítica, com 374 ESTs (55,4%), seguido por atividade ligadora, com 358 ESTs (53,0%) e molécula estrutural, com 143 ESTs (21,2%).

Tabela 6 - Classificação das seqüências das bibliotecas HC1 e HT1 segundo os termos do GO

Termo do <i>Gene Ontology</i>	Número de ESTs da biblioteca HC1 (%)	Número de ESTs da biblioteca HT1 (%)
Componente Celular	517 (100)	655 (100)
Célula	480 (92,8)	626 (95,6)
Componente celular desconhecido	50 (9,8)	56 (8,5)
Extra-celular	38 (7,4)	48 (7,3)
Obsoleto	17 (3,3)	21 (3,2)
Não localizado	11 (2,1)	56 (8,5)
Processo Biológico	590 (100)	692 (100)
Comportamento	22 (3,7)	29 (4,2)
Processo biológico Desconhecido	25 (4,2)	68 (9,8)
Processo celular	344 (57,6)	428 (61,8)
Desenvolvimento	146 (24,7)	239 (34,5)
Processo fisiológico	404 (68,5)	519 (75)
Obsoleto	55 (9,3)	71 (10,3)
Função Molecular	585 (100)	675 (100)
Atividade antioxidante	2 (0,3)	2 (0,3)
Atividade de regulação da apoptose	7 (1,2)	6 (0,9)
Ligação (Ligante)	288 (59,2)	358 (53,0)
Atividade catalítica	284 (48,5)	374 (55,4)
Atividade de molécula de adesão celular	1 (0,2)	3 (0,4)
Atividade de chaperona	34 (5,8)	34 (5,0)
Atividade de regulador do citoesqueleto	6 (1,0)	2 (0,3)
Atividade de regulador enzimático	32 (5,5)	59 (8,7)
Função molecular desconhecida	24 (4,1)	35 (5,2)
Atividade motora	3 (0,5)	2 (0,3)
Obsoleto	23 (3,9)	28 (4,2)
Atividade de direcionamento de proteína	3 (0,5)	5 (0,7)
Atividade de transdutor de sinais	36 (6,2)	26 (3,9)
Atividade de molécula estrutural	63 (10,8)	143 (21,2)
Atividade de regulador da transcrição	15 (2,6)	31 (4,6)
Atividade de transportador	54 (9,2)	115 (17,0)
Toxina	0 (0)	2 (0,3)

Quanto às seqüências da biblioteca HC1 classificadas na ontologia componente celular (Tabela 6), 480 ESTs (92,8%) foram inseridas no termo célula, 50 ESTs (9,8%) no termo componente celular desconhecido, 38 ESTs (7,4%) no termo extra-celular, 17 ESTs (3,3%) foram classificadas como obsoletas e 11 ESTs (2,1%) foram inseridas no termo não localizada. Das

seqüências desta biblioteca classificadas na ontologia processo biológico, a maior parte (404 ESTs; 68,5%) foi enquadrada no termo processo fisiológico, seguido por processo celular (344 ESTs; 57,6%) e desenvolvimento (146 ESTs; 24,7%). Em relação às seqüências classificadas na ontologia função molecular, 288 ESTs (59,2%) foram enquadradas no termo ligante e 284 ESTs, o que corresponde a 48,5% destas seqüências, foram inseridas no termo atividade catalítica.

Observou-se uma distribuição similar das ESTs de ambas as bibliotecas entre os termos do GO, sendo que, das seqüências classificadas na ontologia componente celular, a maior parte foi inserida no termo célula; no termo processo fisiológico, para a ontologia processo biológico e no termo atividade catalítica, para a ontologia função molecular (Figuras 19, 20 e 21). Isto se deve ao número aproximado de ESTs seqüenciadas das bibliotecas e aos padrões de expressão (*expression profile*) similares dos genes expressos nas estruturas estudadas (hipófise e hipotálamo) das duas linhagens.

Figura 19 - Distribuição das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 dentro dos termos da ontologia componente celular

Figura 20 - Distribuição das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 dentro dos termos da ontologia processo biológico

Figura 21 - Distribuição das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 dentro dos termos da ontologia Função Molecular

Comparando a distribuição das ESTs de cada biblioteca dentro dos termos das três ontologias, de uma maneira geral, o número de ESTs na biblioteca HT1 foi maior do que da biblioteca HC1, exceto no caso dos termos atividade de transdutor de sinais e atividade de chaperona, da ontologia função molecular (Figura 21). Um maior número de ESTs da biblioteca HC1 foi inserido no termo atividade de transdutor de sinais e um número igual de ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 foi enquadrado no termo atividade de chaperona. Este resultado sugere que um maior número de genes codificadores de proteínas participantes do processo de transdução de sinais podem ser melhor expressos no hipotálamo e hipófise das aves da linhagem de postura CC.

4.8 Padrão de Expressão Digital (*Digital Expression Profile*)

A análise do padrão de expressão digital é um dos métodos de análise de expressão gênica em larga escala. Consiste na digestão, com a enzima *MboI* (GATC), da extremidade 3' dos clones das bibliotecas de cDNA e seqüenciamento das “assinaturas” dos genes - pequena seqüência entre a região cortada pela *MboI* e a cauda poli-A - resultantes. O número destas “assinaturas”, após seqüenciamento ao acaso, é proporcional à abundância do produto gênico correspondente no tecido, ou tipo celular, que deu origem à biblioteca.

Desta forma, o monitoramento da frequência relativa de tais produtos é capaz de ilustrar o padrão de expressão de diversos genes em função do tecido, estágio de desenvolvimento e/ou estado fisiológico. Esta informação possibilita a discriminação dos genes entre aqueles que desempenham funções constitutivas, daqueles candidatos a serem tecido, estágio de desenvolvimento ou estado fisiológico específicos (OKUBO et al., 1995; AUDIC; CLAVERIE, 1997).

Apesar desta metodologia ter sido inicialmente desenvolvida com base na extremidade 3' dos clones das bibliotecas de cDNA, o seu emprego para análise da extremidade 5' destes tem sido eficaz para a identificação de genes que apresentam padrões de expressão distintos (HORIBA et al., 2004).

Embora exista um grande número de estudos sobre qual metodologia estatística seja mais adequada para a identificação dos genes diferencialmente expressos em uma determinada situação, há evidências de que pequenas mudanças no nível de expressão dos genes possam

causar acentuadas mudanças fisiológicas. Sendo assim, foram considerados diferencialmente expressos, os genes cuja abundância de seus produtos (ESTs) foi no mínimo três vezes maior em uma biblioteca em relação à outra, ou que a diferença subtrativa entre as bibliotecas tenha sido igual ou maior do que dois, quando o produto gênico correspondente não estava presente em uma das bibliotecas.

Dos 389 *contigs*, 194 (49,9%) foram constituídos por seqüências diferencialmente expressas entre as bibliotecas, sendo que 102 (26,2%) apresentaram seqüências mais abundantes na biblioteca HC1 (Tabela 7) e 92 (23,7%), seqüências mais abundantes na HT1 (Tabela 8). Os 195 *contigs* restantes não puderam ter seus genes correspondentes, considerados diferencialmente expressos.

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(continua)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1021H11.g	CO420065	Sem similaridade com as seqüências do banco (<i>no hit</i>)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1013D11.g	CO419939	Proteína hipotática – <i>Mus musculus</i> (gi 12846595)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005C12.g	CO419760	Proteína associada à sinapse 102 – <i>Homo sapiens</i> (gi NP_066943.1)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1017C11.g	CO420096	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1003C10.g	CO419670	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1003E02.g	CO419685	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1023H07.g	CO420425	Proteína-G acoplada ao receptor de esfingolípídeo 1 – <i>Homo sapiens</i> (gi 13027636)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1021G07.g	CO420050	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015E10.g	CO419522	Proteína nuclear 2 do complexo ubiquinol-citocromo C redutase, precursor mitocondrial – <i>Homo sapiens</i> (gi 21903482)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1006H08.g	CO420751	Proteína ribossomal L10 – <i>Gallus gallus</i> (gi 1172808)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1007F09.g	CO420273	Seqüência de <i>Homo sapiens</i> semelhante à 13 mbt de <i>Drosophila</i> (gi 13162228)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1014B12.g	CO420531	Fosfodiesterase específica de camp, isoforma PDE4B4 - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 16930145)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1021A10.g	CO419986	Fator 1 de ribosilação do ADP - <i>Homo sapiens</i> (gi NP_001649.1)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1022E10.g	CO420955	Superóxido dismutase - <i>Gallus gallus</i> (gi 2134412)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1009E05.g	CO420476	Proteína proteolipídica da mielina - <i>Gallus gallus</i> (gi 45384124)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1017E04.g	CO420109	Proteína hipotética DKFZp586O1922.1 - <i>Homo sapiens</i> (gi 7512942)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1024C01.g	CO421252	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005B07.g	CO421252	Precursor da glutathione peroxidase plasmática (GSHPx-P) – camundongo (NCBI, 2006b) (gi 1170039)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1009B05.g	CO420443	FKSG11 - <i>Homo sapiens</i> (gi 15865601)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1012H12.g	CO419897	Inibidor de ribonuclease/angiogenina - <i>Homo sapiens</i> (gi 21361547)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1012C12.g	CO419843	Proteína MGC64475 - <i>Xenopus laevis</i> (gi 27694747)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1015G05.g	CO419539	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1001G01.g	CO420199	Proteína do timócito Thy28 - <i>Gallus gallus</i> (gi 46048964)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1021G09.g	CO420052	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1019A10.g	CO420604	<i>No hit</i>	3	0	
GGEZHC1009D04.g	CO420464	Proteína similar à <i>Lactoylglutathione lyase</i> - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 27704948)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1003E11.g	CO419694	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1020G12.g	CO421138	Transcriptase reversa, <i>pol-like</i> – <i>Gallus gallus</i> (gb AAA49027.1)	4	0	0,93 – 0,94
GGEZHC1013A09.g	CO419904	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1007G10.g	CO420281	Proteína com repetição WD, ativadora das células-T - <i>Homo sapiens</i> (gi 21205868)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1024H10.g	CO421315	4-alfa-glucanotransferase / amilo-1, 6-glucosidase – <i>Homo sapiens</i> (gi 105131)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1010G04.g	CO419621	Antígeno 2 de célula tronco - <i>Gallus gallus</i> (gi 45382129)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015E06.g	CO419518	Proteína desconhecida - <i>Homo sapiens</i> (gi 18027374)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1025C12.g	CO420320	Supressor 1 da via de sinalização da proteína-G - <i>Homo sapiens</i> (gi 5713317)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1013B11.g	CO419917	Proteína 1 de interação com a actina, contendo repetição WD - <i>Gallus gallus</i> (gi O93277)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1010C08.g	CO419582	Proteína - HSPC166 - <i>Homo sapiens</i> (gi 7661828)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015F12.g	CO419535	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1024D12.g	CO421272	Fosfoproteína Lasp-1 - <i>Oryctolagus cuniculus</i> (gi 3319229)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1023F01.g	CO420400	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015D05.g	CO419505	Proteína p150 associada à fosfatidilinositol 3 kinase - <i>Homo sapiens</i> (gi 23943912)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1009G02.g	CO420494	Proteína hipotética XP_209943 - <i>Homo sapiens</i> (gi XP_209943.1)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1009D10.g	CO420469	Proteína de 160 kDa do neurofilamento M - <i>Gallus gallus</i> (gi 128146)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015H04.g	CO419550	Glicoproteína M6A, isoforma 1 - <i>Homo sapiens</i> (gi 14149619)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1021A08.g	CO419984	Fator 1 derivado de dendritos - <i>Homo sapiens</i> (gi AAH16374.1)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1017G08.g	CO420134	cDNA RIKEN C330023F11 - <i>Mus musculus</i> (gi XP_129627.1)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1007A08.g	CO420219	Proteína similar à <i>rRNA intron-encoded homing endonuclease</i> - <i>Homo sapiens</i> (gi 41125794)	4	0	0,93 – 0,94
GGEZHC1011B04.g	CO420763	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005E07.g	CO419778	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1003F01.g	CO419696	Proteína ligadora de fosfatidiletanolamina PEBP - <i>Bos taurus</i> (gi 1352725)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1019H03.g	CO420674	Proteína Hlf - <i>Mus musculus</i> (gi 34785921)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1023H06.g	CO420424	Mitofusina 1 - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 20376820)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1003C05.g	CO419665	Provável mucina G2 - <i>Homo sapiens</i> (gi 7512446)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1018B04.g	CO421161	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015B03.g	CO419483	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005H05.g	CO419809	Proteína de ativação da tirosina 3-monooxigenase/triptofan o 5-monooxigenase, polipeptídeo teta - <i>Mus musculus</i> (gi 6756039)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1017B04.g	CO420079	Subunidade 7 do proteassomo, tipo beta - <i>Gallus gallus</i> (gi 45383366)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1003E05.g	CO419688	Glicosiltransferase, subunidade de 48 kDa – <i>Gallus gallus</i> (gi 1352649)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1008H01.g	CO421472	Similar à região de ligação a RNA, RNP 1, RRM - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 34860256)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1004H06.g	CO420899	Proteína localizada no ER, relacionada a olfactomedina neuronal - <i>Gallus gallus</i> (gi 45382111)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1010D02.g	CO419588	Similar à proteína hipotética DKFZp547C176 - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 34863409)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1021D05.g	CO420016	Proteína-G, gama 3 - <i>Danio rerio</i> (gi 18858767)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1015G07.g	CO419541	Espectrina beta, não eritrocítica, isoforma 1 - <i>Homo sapiens</i> (gi 4507195)	4	0	0,93 – 0,94
GGEZHC1004F10.g	CO420880	<i>N-myc downstream regulated gene 1</i> - <i>Homo sapiens</i> (gi 37655183)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1021E03.g	CO420024	Precursor de timosina beta-4 - rato (gi 2143995)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1003D08.g	CO419680	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1011D10.g	CO420788	Cadeia leve intermediária da dineína (<i>dynein</i>) - <i>Gallus gallus</i> (gi 2494217)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1012D12.g	CO419853	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1008F01.g	CO421451	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1001A07.g	CO420151	<i>No hit</i>	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005H02.g	CO419806	<i>No hit</i>	3	0	0,80 – 0,90

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1026D09.g	CO421553	Glutamato descarboxilase 67 (GAD67) - <i>Gallus gallus</i> (gi:46048859)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1017D05.g	CO420101	Proteína hipotética BC007436 - <i>Homo sapiens</i> (gi 34147529)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1006H05.g	CO420748	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1012C03.g	CO419834	Proteína My027 - <i>Homo sapiens</i> (gi 12001996)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1023H09.g	CO420427	Na ⁺ /K ⁺ -exchanging ATPase beta-1 chain – <i>Gallus gallus</i> (gi 86380)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1006B07.g	CO420697	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1013G07.g	CO419964	Antígeno 1 ventral neuro-oncológico, isoforma 2 - <i>Homo sapiens</i> (gi 6031187)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1010C04.g	CO419578	Actina, gama 1 - <i>Homo sapiens</i> (gi 4501887)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHC1022A11.g	CO420912	Proteína hipotética LOC127262 - <i>Homo sapiens</i> (gi 38679907)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1007B06.g	CO420229	Rab Geraniltransferase - <i>Homo sapiens</i> (gi 1552549)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1001D08.g	CO420181	Precursor da proteína dissulfeto isomerase A6 - <i>Mesocricetus auratus</i> (gi 729443)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1019B11.g	CO420615	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1010F06.g	CO419611	Similar à proteína Tde1 - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 34860658)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1018B09.g	CO421165	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005A12.g	CO419738	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1012D11.g	CO419852	NGF-inducible anti-proliferative putative secreted protein - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 8393002)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1010G06.g	CO419623	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1022B12.g	CO420925	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1019G11.g	CO420670	Calsinténina 3 (<i>calsyntenin 3</i>) - <i>Mus musculus</i> (gi NP_705728.1)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 7 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem CC (biblioteca HC1)

(conclusão)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Intervalo de confiança*
GGEZHC1005C06.g	CO419755	Proteína relacionada à actina - <i>Homo sapiens</i> (gi 22907052)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1019F09.g	CO420656	Debrina A (<i>drebrin A</i>) – <i>Gallus gallus</i> (gi 410607)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1014F06.g	CO420570	2C4D - <i>Homo sapiens</i> (gi 33150686)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHC1005F01.g	CO419784	Proteína KIAA0987 - <i>Homo sapiens</i> (gi 4589618)	3	1	0,60 – 0,70
GGEZHT1005H11.g	CO422037	Fosfoglucoase isomerase - <i>Boiga kraepelini</i> (gi CAC83780.1)	3	1	0,60 – 0,70
GGEZHC1007D04.g	CO420247	Carboxipeptidase E - <i>Mus musculus</i> (gi 22203763)	3	1	0,60 – 0,70
GGEZHC1015E05.g	CO419517	Calmodulina - <i>Homo sapiens</i> (gi 30583815)	3	1	0,60 – 0,70
GGEZHC1015D11.g	CO419511	Proteína mitocondrial - <i>Gallus gallus</i> (gi:28629852)	68	10	> 0.99
GGEZHT1022E12.g	CO421930	SPARC - <i>Gallus gallus</i> (gi 45383337)	7	2	0,80 – 0,90
GGEZHC1021F05.g	CO420036	Fator eucariótico de iniciação da tradução 4AII - <i>Gallus gallus</i> (gi AAM53975.1)	4	1	0,70 – 0,80
GGEZHT1001G07.g	CO422828	THY1 - <i>Gallus gallus</i> (gi AAP31241.1)	3	1	0,60 – 0,70

* Intervalo de confiança calculado com base no nível de significância arbitrário e tamanho amostral (AUDIC; CLAVERIE, 1997).

Tabela 8 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)

(continua)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Intervalo de confiança*
GGEZHT1018D02.g	CO421746	Visinin-like 1 - <i>Mus musculus</i> (gi 6755983)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1005B08.g	CO421978	Piruvato desidrogenase fosfatase isoenzima 1 - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 9506963)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1015B07.g	CO423107	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1006B04.g	CO422526	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020C06.g	CO421649	Stathmin 2 SCG10 - <i>Gallus gallus</i> (gi 4033470)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1022A02.g	CO421878	Cadeia regulatória alfa, tipo I, da proteína kinase dependente de cAMP – <i>Bos taurus</i> (gi 125192)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1022D11.g	CO421918	cognin/prolyl-4-hydroxylase/protein disulfide isomerase - <i>Gallus gallus</i> (gi 21703694)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1013E03.g	CO422887	Inibidor da dissociação Rab-GDP - <i>Gallus gallus</i> (gi 45384364)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1005D03.g	CO421997	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1008H08.g	CO421872	Cromogranina A - <i>Mus musculus</i> (gi 6680932)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1025E02.g	CO422226	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1006D01.g	CO422545	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1005C09.g	CO421991	KIAA0005 - <i>Homo sapiens</i> (gi 40789056)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020D05.g	CO421658	Ninjurina 2 - <i>Homo sapiens</i> (gi 39725946)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1018A11.g	CO421720	Poli-ubiquitina - <i>Artemia franciscana</i> (gi 510473)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1004G01.g	CO423414	KIAA0372 - <i>Homo sapiens</i> (gi 40788230)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1007B04.g	CO422446	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020B01.g	CO421637	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1022H07.g	CO421955	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1010F02.g	CO422156	Receptor 17 com proteína-G acoplada - <i>Homo sapiens</i> (gi 4885301)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 8 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Intervalo de confiança*
GGEZHT1026E02.g	CO422970	Proteína fosfatase 1, subunidade regulatória 7 (gi 4506013)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1023A01.g	CO422039	Proteína básica constituinte da mielina - <i>Gallus gallus</i> (gi 45384134)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1018H10.g	CO421790	Similar à proteína ribossomal S14 - <i>Bos taurus</i> (gi 28189929)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1011F06.g	CO422652	B-creatina kinase - <i>Gallus gallus</i> (gi 45384340)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1011H12.g	CO422677	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1022A11.g	CO421885	Neurotelina (<i>basigin precursor Blood-brain barrier HT7 antigen</i>) - <i>Gallus gallus</i> (gi 123714)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1015H12.g	CO423177	PiUS - <i>Oryctolagus cuniculus</i> (gi 1872498)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1019D12.g	CO423221	Proteína hipotética - <i>Mus musculus</i> (gi 26376452)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1008D05.g	CO421827	RIKEN 110066L09 – cDNA, <i>Mus musculus</i> (gi 20986242)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1008A02.g	CO421794	Prosencefalina (<i>proenkephalin</i>) - <i>Homo sapiens</i> (gi 5453876)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1003G04.g	CO422415	RIKEN 2900026H06 – cDNA, <i>Mus musculus</i> (gi 21312161)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1016E07.g	CO422308	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1014B05.g	CO422692	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1010A04.g	CO422107	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1011D11.g	CO422635	Fator 6 de biogênese peroxissomal - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 16923976)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1011B04.g	CO422610	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1009B03.g	CO423697	Proteína robossomal, mitocondrial, S22 - <i>Mus musculus</i> (gi 13384904)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 8 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Intervalo de confiança*
GGEZHT1002A12.g	CO423276	Proteína hipotética FLJ13910 - <i>Homo sapiens</i> (gi 12232469)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1025B08.g	CO422203	Fator 1 associado ao receptor de vitamina D – camundongo (gi 7446006)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1023E01.g	CO422070	Piruvato kinase - <i>Gallus gallus</i> (gi 45382651)	5	0	0,96 – 0,97
GGEZHT1018A04.g	CO421715	Vitronectina - <i>Gallus gallus</i> (gi 46048795)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1011D10.g	CO422634	<i>Bicaudal D homolog 2</i> - <i>Mus musculus</i> (gi 18139547)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020G04.g	CO421692	Proteína hipotética FLJ10154 - <i>Homo sapiens</i> (gi 8922259)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1015F02.g	CO423147	Ovotransferrina - <i>Gallus gallus</i> (gi 1127086)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1008A12.g	CO421804	No hit	4	0	0,93 – 0,94
GGEZHT1017D07.g	CO423470	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1022C12.g	CO421907	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GEZHT1007C11.g	CO422460	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1018G08.g	CO421780	Wpkci - <i>Gallus gallus</i> (gi 45382715)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1018G03.g	CO421776	No hit	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1008A09.g	CO421801	Proteína 2 ligadora de de integrina 1 beta, músculo-específica - <i>Danio rerio</i> (gi 38564415)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1003E09.g	CO422398	No hit	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1015G01.g	CO423157	<i>Dependent high affinity dicarboxylate transporter 3</i> - <i>Homo sapiens</i> (gi 31377715)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1021A04.g	CO423015	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1022B07.g	CO421892	Pantotenato kinase 3 - <i>Homo sapiens</i> (gi 13375789)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020A03.g	CO421629	Proteína 2 associada ao microtúbulo - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 6981182)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 8 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Intervalo de confiança*
GGEZHT1020B03.g	CO421639	Proteína hipotética MGC76121 - <i>Xenopus tropicalis</i> (gi 45361481)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1001A12.g	CO422768	Proteína de 150 kDa regulada por oxigênio - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 20302024)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020B07.g	CO421643	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020H10.g	CO421709	Proteína de fusão vesicular NSF – Hamster chinês (gi 90219)	4	0	0,93 – 0,94
GGEZHT1020E08.g	CO421672	Major prion protein homolog precursor PR-LP, Acetylcholine receptor-inducing activity - <i>Gallus gallus</i> (gi 400846)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1014B11.g	CO422697	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1011A11.g	CO422605	hnRNP M - <i>Homo sapiens</i> (gi 1710636)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1005E06.g	CO422008	Proteína hipotética MGC75936 - <i>Xenopus tropicalis</i> (gi 45360605)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1012E10.g	CO423571	Similar ao clone de cDNA RIKEN 2810037C03 - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 27673372)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1019B05.g	CO423192	Proteína ligadora - <i>Homo sapiens</i> (gi 553204)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020F01.g	CO421677	No hit	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1005C08.g	CO421990	Proteína hipotética - <i>Mus musculus</i> (gi 26345022)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1014E01.g	CO422720	Open reading frame 12 do cromossomo 13 - <i>Homo sapiens</i> (gi 7705429)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1003D09.g	CO422388	Porina, isoforma 1 - <i>Homo sapiens</i> (gi 6063691)	2	0	0,70 – 0,80

Tabela 8 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)

(continuação)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Intervalo de confiança*
GGEZHT1002H11.g	CO423350	Ubiquinol-citocromo c redutase - <i>Mus musculus</i> (gi 13385168)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1024G01.g	CO423663	Isocitrato desidrogenase citoplasmática (NADP) - <i>Microtus ochrogaster isocitrate</i> (gi 6647566)	22	0	> 0,99
GGEZHT1006G10.g	CO422585	Proteína 1 B mediadora da resposta da colapsina - <i>Gallus gallus</i> (gi 45383179)	3	0	0,80 – 0,90
GGEZHT1003H08.g	CO422429	Proteína hipotética MBNC051602 - <i>Mesorhizobium sp.</i> (gi 45917236)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1018B05.g	CO421726	No hit	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1006H11.g	CO422596	Brevican core protein precursor, brain enriched hyaluronan binding protein - <i>Felis catus</i> (gi 2507585)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1025C08.g	CO422212	Serina protease ligadora de IGF-II - <i>Rattus norvegicus</i> (gi 13929012)	2	0	0,70 – 0,80
GGEZHT1020G07.g	CO421694	Cadeia H da ferritina - <i>Gallus gallus</i> (gi 45384172)	8	2	0,93 – 0,94
GGEZHT1020F04.g	CO421680	chS-Rex-s RTN1-C - <i>Gallus gallus</i> (gi 1143721)	4	1	0,70 – 0,80
GGEZHT1020C01.g	CO421647	No hit	13	2	0,996 – 0,997
GGEZHC1015C05.g	CO419495	Precursor de angiotensinogênio - <i>Mus musculus</i> (gi P11859)	3	1	0,60 – 0,70
GGEZHT1005A05.g	CO421965	No hit	4	1	0,70 – 0,80
GGEZHT1019G09.g	CO423252	Calretinina - <i>Gallus gallus</i> (gi 45384332)	3	1	0,60 – 0,70
GGEZHT1023B03.g	CO422047	Proteína 1 inibidora da proteína kinase C - <i>Homo sapiens</i> (gi 5803225)	3	1	0,60 – 0,70

Tabela 8 - Relação dos *contigs* cujas seqüências foram mais encontradas na biblioteca da hipófise e hipotálamo das aves da linhagem TT (biblioteca HT1)

(conclusão)

Contig	Número de acesso do GenBank	Resultado do blastx (nr)	Nº de aparecimento na biblioteca HT1	Nº de aparecimento na biblioteca HC1	Intervalo de confiança*
GGEZHT1005G10.g	CO422026	Subunidade 4 da NADH desidrogenase - <i>Gallus gallus</i> (gi P18939)	9	2	0,96 – 0,97
GGEZHT1005F02.g	CO422015	Fator eucariótico de elongação da tradução 1, alfa 2 (<i>statin S1</i>) – <i>Homo sapiens</i> (gi 4503475)	4	1	0,70 – 0,80
GGEZHT1016B06.g	CO422275	ATP sintase, transportador de H ⁺ , complexo mitocondrial F1 - <i>Gallus gallus</i> (gi 45383566)	4	1	0,70 – 0,80
GGEZHT1007B07.g	CO422449	<i>No hit</i>	6	2	0,80 – 0,90
GGEZHT1005A11.g	CO421970	Subunidade II da citocromo oxidase - <i>Gallus gallus</i> (gi 28557158)	8	2	0,93 – 0,94
GGEZHT1008C02.g	CO421814	Inibidor de crescimento dos neuritos NOGO-A - <i>Gallus gallus</i> (gi 42528325)	4	1	0,70 – 0,80
GGEZHT1008D04.g	CO421826	Actina citoplasmática, tipo 5 – Sapo afriacano (gi 1703123)	6	1	0,93 – 0,94
GGEZHT1020D11.g	CO421663	Membro 8 da superfamília de proteínas transmembrana 4, isoforma 1 - <i>Homo sapiens</i> (gi 5032201)	3	1	0,60 – 0,70

* Intervalo de confiança calculado com base no nível de significância arbitrário e tamanho amostral (AUDIC; CLAVERIE, 1997).

Os genes que apresentaram diferença no nível de expressão entre as linhagens de corte (HT1) e postura (HC1) devem ser cuidadosamente estudados, uma vez que podem ser capazes de explicar algumas das diferenças fisiológicas e, conseqüentemente, fenotípicas observadas entre estas linhagens. Alguns destes genes podem estar diretamente envolvidos em tais diferenças, uma vez que codificam proteínas que atuam em importantes vias de sinalização, como proteínas

kinases dependentes de cálcio/calmodulina, receptores acoplados a proteínas G, cAMP fosfodiesterase, calmodulina 2 e fosfoinosítideo-3-kinase (vias envolvidas nos processos de síntese e secreção dos hormônios de crescimento – GH, luteinizante – LH, e folículo-estimulante – FSH, e conseqüentemente, nos processos de crescimento e reprodução). Enquanto concentrações elevadas de cAMP levam à ativação da proteína kinase A (PKA), níveis elevados de cálcio, acarretam na ativação da PKC. Estas promovem a fosforilação de proteínas intracelulares, o que desencadeia respostas celulares imediatas, como modificação das vias metabólicas e regulação do fluxo de íons. A via de sinalização do cAMP, pode, também, atuar sobre a transcrição de genes alvo, por meio da ativação da proteína ligadora do elemento de resposta ao cAMP (*CREB*) ou modificações de proteínas estruturais da cromatina (MUNTZ et al., 1992, SHEPHERD; POLOGRUTO; SVOBODA, 2003).

ESTs relacionadas a proteínas envolvidas na transcrição gênica, tais como transcriptase reversa, proteína de fusão E2A/HLF e fator de *splicing* de 45kD também foram diferencialmente identificadas entre as bibliotecas.

Duas ESTs referentes ao gene 1 regulado *downstream* pelo *N-myc* (NDR1) foram identificadas apenas na linhagem de postura (CC). Por atuar como um possível inibidor do crescimento (SwissProt, [Q92597](#)), este gene (ou via molecular) pode ser um dos responsáveis pela nítida diferença no potencial de crescimento observada entre as linhagens.

4.9 Identificação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Após montagem das seqüências, por meio do programa Cap3, as ESTs agrupadas no mesmo *contig* foram alinhadas, e a presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) foi verificada de acordo com os parâmetros estipulados no item 3.10.2.

Dos 389 *contigs* obtidos, 28 (7,2%) apresentaram 77 SNPs linhagem específicos, correspondendo a 52 SNPs TT específicos e 25 CC específicos (Figura 22 e Tabela 9). A maior parte dos SNPs foi encontrada em ESTs relacionadas a proteínas mitocondriais, estruturais ou moduladoras da estrutura de outras proteínas, constituintes neuronais, ribossomais e ligadoras de ferro. Também foram observados SNPs em proteínas hipotéticas - proteínas sem função biológica definida -, ligadoras de cálcio, relacionadas ao metabolismo de lipídeos e em ESTs que não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência do banco consultado. Este segundo grupo

pode estar mais relacionado às diferenças observadas entre as linhagens, porém, para uma melhor compreensão da influência destes polimorfismos, estudos mais direcionados, como a análise de genes candidatos, devem ser efetuados.

Figura 22 - Distribuição dos SNPs CC e TT específicos entre os 28 *contigs*

O valor de qualidade PHRED das bases destes SNPs variou de 20 a 68, apresentando um valor médio de 50,1. Destes 28 *contigs*, 14 (50,0%) foram compostos por apenas um SNP, seis (21,4%) foram compostos por dois SNPs, três (10,7%) por três SNPs, um *contig* (3,6%) foi composto por cinco SNPs, um (3,6%) por sete SNPs, dois *contigs* (7,1%) por oito SNPs e um (3,6%) por 14 SNPs (Figura 22).

Tabela 9 - Relação dos SNPs linhagem específicos encontrados nos 28 contigs

(continua)

Contig	Nº de ESTs - Tamanho	ESTs por linhagem	Consenso	Mutação (linhagem - nº de repetição)	Posição (qualidade PHRED das bases)	Identificação
GGEZHC1015D02.g	112 ESTs / 2.739 pb	52 CC/60 TT	A	G (TT – 2)	61 (q:30,30)	Proteína básica constituinte da mielina – <i>Gallus gallus</i> (X17103)
			A	C (TT – 2)	67 (q: 22, 24)	
			T	A (CC – 2)	72 (q: 43, 53)	
			C	G (CC – 2)	73 (q: 43, 53)	
			A	T (TT – 2)	80 (q: 33, 57)	
			G	C (TT – 2)	99 (q: 53, 47)	
			G	A (TT – 2)	460 (q: 30, 20)	
			A	G (CC – 5)	942 (q: 57, 62, 57, 62, 39)	
			C	T (TT – 4)	1008 (q: 62, 52, 20, 68)	
			T	C (TT – 5)	1494 (q: 68, 47, 62, 28, 50)	
			T	C (CC – 3)	1541 (q: 20, 53, 68)	
			A	G (TT – 4)	1680 (q: 68, 68, 68, 21)	
			G	A (TT – 2)	1818 (q: 52, 39)	
			C	T (TT – 2)	1872 (q: 20, 22)	
GGEZHC1015A03.g	90 ESTs / 1.703 pb	49 CC/41 TT	A	T (CC – 2)	37 (q: 50, 53)	Proteína codificada pelo genoma mitocondrial – <i>Gallus gallus</i> (AY235571)
			A	T (CC – 2)	672 (q: 36, 22)	
GGEZHC1015D11.g	78 ESTs / 1.862 pb	68 CC/10 TT	T	G (CC – 4)	61 (q: 43, 30, 37, 35)	Proteína codificada pelo genoma mitocondrial – <i>Gallus gallus</i> (AY235571)
			T	C (CC – 5)	62 (q: 22, 43, 37, 42, 42)	
			A	G (CC – 5)	63 (q: 27, 53, 44, 42, 43)	
			A	T (CC – 5)	64 (q: 54, 53, 53, 47, 50)	
			T	G (CC – 4)	67 (q: 57, 57, 53, 57)	
GGEZHC1015D06.g	35 ESTs / 1.356 pb	17 CC/18 TT	A	C (TT – 2)	106 (q: 47, 68)	Proteína proteolipídica constituinte da mielina – <i>Gallus gallus</i> (X61661)
			G	A (TT – 2)	107 (q: 36, 68)	
			G	C (TT – 2)	110 (q: 53, 68)	
			A	T (TT – 2)	112 (q:57, 57)	
			A	C (TT – 2)	114 (q: 59,57)	
			G	C (CC – 3)	128 (q: 36, 33, 33)	
			A	G (CC – 3)	132 (q: 50, 50, 42)	
			G	C (CC – 2)	137 (q:47, 47)	

Tabela 9 - Relação dos SNPs linhagem específicos encontrados nos 28 contigs

(continuação)

Contig	Nº de ESTs – Tamanho	ESTs por linhagem	Consenso	Mutação (linhagem – nº de repetição)	Posição (qualidade PHRED das bases)	Identificação
GGEZHC1015G12.g	32 ESTs / 805 pb	14 CC/18 TT	A C	C (TT – 3) G (TT – 2)	17 (q: 47,47,42) 19 (q: 53, 47)	Proteína codificada pelo genoma mitochondrial – <i>Gallus gallus</i> (AY235571)
GGEZHT1020D07.g	27 ESTs / 2.059 pb	14 CC/13 TT	A C	G (TT – 3) G (TT – 2)	1005 (q: 41, 68, 26) 1877 (q: 40, 46)	Proteína proteolipídica constituinte da mielina (PLP) – <i>Taeniopygia guttata</i> (S75729)
GGEZHT1020E04.g	20 ESTs / 1.185 pb	8 CC/12 TT	A	T (CC – 2)	729 (q:22, 22)	Citocromo b – <i>Gallus gallus</i> (X52392)
GGEZHC1010H06.g	20 ESTs / 3.006 pb	9 CC/11 TT	G C	A (TT – 2) T (TT – 2)	119 (q: 47, 68) 365 (q: 62, 68)	Heat shock protein 90 kDa (Hsp90) – <i>Gallus gallus</i> (X07265)
GGEZHC1015H09.g	19 ESTs / 1.814 pb	10 CC/9 TT	T	C (CC – 2)	1158 (q: 54, 68)	Citocromo b – <i>Gallus gallus</i>
GGEZHT1008G11.g	17 ESTs / 1.343 pb	6 CC/11 TT	C	T (TT – 2)	238 (q: 32, 62)	Afa-tubulina – <i>Gallus gallus</i> (V00388 J00912)
GGEZHT1020C01.g	15 ESTs / 1.418 pb	2 CC/13 TT	G G G A A A A	A (TT – 2) A (TT – 3) A (CC – 2) G (TT – 2) C (TT – 2) G (TT – 2) G (TT – 2)	125 (q:68, 68) 434 (q: 68, 68, 62) 466 (2; 32, 47) 767 (q: 43, 39) 780 (q: 32, 27) 885 (q: 59, 30) 907 (q: 57, 35)	Não apresentou similaridade com nenhuma sequência do banco
GGEZHT1005F03.g	14 ESTs / 880 pb	9 CC/5 TT	T C G T A G G C	C (CC – 3) T (TT – 2) A (TT – 2) C (TT – 2) C (TT – 2) A (CC – 3) A (TT – 2) G (CC – 3)	105 (q: 35, 68, 68) 174 (q: 68, 27) 249 (q: 68, 44) 264 (q: 57, 41) 354 (q: 50, 68) 447 (q: 39, 48, 50) 477 (q: 37, 35) 537 (q: 24, 46, 37)	Ubiquitina I – <i>Gallus gallus</i> (M14693)

Tabela 9 - Relação dos SNPs linhagem específicos encontrados nos 28 contigs

(continuação)

Contig	Nº de ESTs – Tamanho	ESTs por linhagem	Consenso	Mutação (linhagem – nº de repetição)	Posição (qualidade PHRED das bases)	Identificação
GGEZHT1005G10.g	11 ESTs / 1.425 pb	2 CC/9 TT	T	C (CC – 2)	667 (2; 62, 51)	Proteína codificada pelo genoma mitochondrial – <i>Gallus gallus</i> (AP003317)
GGEZHT1018G02.g	11 ESTs / 1.302 pb	4 CC/7 TT	C	G (TT – 4)	459 (q: 42,48, 50, 52)	Apolipoproteína A1 – <i>Gallus gallus</i> (M18746)
			C	T (TT – 4)	516 (q: 52, 59, 68, 41)	
GGEZHT1016F06.g	10 ESTs / 1.667 pb	4 CC/6 TT	T	C (TT – 2)	747 (q: 22, 21)	Enolase alfa – <i>Gallus gallus</i> (D37900)
			T	C (TT – 2)	283 (q: 68, 42)	
			C	T (TT – 4)	289 (q: 68, 38, 26, 68)	
			G	A (TT – 3)	340 (q: 68, 57, 68)	
GGEZHT1022E12.g	9 ESTs / 1.719 pb	7 CC/2 TT	C	T (TT – 2)	347	SPARC – <i>Gallus gallus</i> (L24906)
			C	T (TT – 2)	377	
GGEZHC1015F09.g	9 ESTs / 1.560 pb	5 CC/4 TT	A	G (TT – 2)	659	Calmodulina – <i>Gallus gallus</i> (AF081672)
			C	T (TT – 2)	989	
GGEZHT1020E10.g	8 ESTs / 746 pb	3 CC/5 TT	A	G (TT – 2)	47	Beta-tubulina, c-beta-3 (M14228)
GGEZHT1022D07.g	7 ESTs / 1.544 pb	3 CC/4 TT	T	C (TT – 2)	967 (q: 35, 41)	Clone BAC RP11-463B12 – <i>Homo sapiens</i> (AC013469)
GGEZHT1022E07.g	7 ESTs / 893 pb	2 CC/5 TT	C	T (TT – 2)	66 (q: 66, 66)	Neurofilamento L – <i>Coturnix japonica</i> (D13222)
GGEZHT1006F01.g	7 ESTs / 883 pb	3 CC/4 TT	T	C (CC – 2)	282 (q: 62, 68)	Proteína ribossomal L7a – <i>Gallus gallus</i> (X62640 S40082)
GGEZHC1003A10.g	7 ESTs / 2.141 pb	3 CC/4 TT	C	T (CC – 2)	459 (q: 68, 68)	ATP/ADP antiporter – <i>Gallus gallus</i> (AB088686)
GGEZHT1005F02.g	5 ESTs / 866 pb	1 CC/4 TT	C	T (TT – 2)	381 (q: 57, 62)	Clone cDNA ChEST61e17 – <i>Gallus gallus</i> (BX934090)

Tabela 9 - Relação dos SNPs linhagem específicos encontrados nos 28 contigs

(conclusão)

Contig	Nº de ESTs - Tamanho	ESTs por linhagem	Consenso	Mutação (linhagem - nº de repetição)	Posição (qualidade PHRED das bases)	Identificação
GGEZHT1016D10.g	5 ESTs / 873 pb	2 CC/3 TT	A G	C (TT – 2) A (CC – 2)	540 (q: 22, 50) 566 (q: 43, 54)	Não apresentou similaridade com nenhuma sequência do banco
GGEZHT1023D11.g	5 ESTs / 1.258 pb	2 CC/3 TT	C	T (TT – 2)	651 (q: 23, 33)	Alfa-tubulina – <i>Gallus gallus</i> (V00388 J00912)
GGEZHC1017F12.g	5 ESTs / 1.428 pb	3 CC/2 TT	T G	C (TT – 2) A (TT – 2)	222 (q: 44, 41) 255 (q: 35, 52)	Clone cDNA ChEST222i6 – <i>Gallus gallus</i> (BX932010)
GGEZHT1016A08.g	4 ESTs / 815 pb	2 CC/2 TT	A	C (TT – 2)	355 (q: 57, 57)	Fator de inibição do complexo de ataque da membrana, precursor da glicoproteína CD59 - <i>Papio sp.</i> (gi 2501523)
GGEZHC1015C05.g	4 ESTs / 1.071 pb	1 CC/3 TT	G	C (TT – 2)	726 (q: 48, 37)	Precursor de angiotensinogênio – <i>Mus musculus</i>

Estes 28 *contigs* foram constituídos por quatro a 112 ESTs, apresentando um número médio de 21,2 ESTs por *contig* (Figura 23) e um tamanho médio de 1.441 pb, sendo que o tamanho mínimo observado foi 746 pb e o máximo 3.006 pb.

Figura 23 - Distribuição das 593 ESTs (das bibliotecas HC1 e HT1) entre os 28 *contigs* apresentando SNPs

A densidade de SNPs dos *contigs* variou de 0,5 a 9,1 SNPs por 1 kb, apresentando uma densidade média de 1,9 SNP/kb. Os SNPs TT específicos apresentaram uma maior densidade do que os CC específicos, sendo os valores de densidade médios 1,3 e 0,6, respectivamente.

Os valores referentes aos SNPs TT específicos foram cerca de duas vezes maiores do que os referentes aos SNPs CC específicos, embora estes *contigs* tenham sido constituídos por um maior número de ESTs referentes à biblioteca HC1 – 305 ESTs da biblioteca HC1 contra 288 ESTs da HT1. O que sugere que a linhagem TT seja mais polimórfica (apresentando maior número de alelos) que a CC.

Estes SNPs linhagem específicos foram classificados de acordo com a substituição de suas bases como transição (purina → purina ou pirimidina → pirimidina) ou transversão (purina → pirimidina ou pirimidina → purina). Dos 77 SNPs identificados, 50 (64,9%) foram classificados como transição, sendo 36 (46,7%) TT específicos e 14 (18,2%) CC específicos, e 27 (35,1%) como transversão, correspondendo a 16 (20,8%) SNPs TT específicos e 11 (14,3%) CC específicos. Este resultado confere uma razão de transição para transversão dos SNPs de 1,85:1.

4.10 Obtenção das Sondas e Impressão das Membranas

4.10.1 Produtos de PCR da mini-preparação plasmidial dos clones selecionados para o estudo de expressão gênica

Os produtos de PCR da mini-preparação plasmidial dos clones selecionados para análise de expressão, tiveram sua qualidade verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 24).

Figura 24 - Eletroforese dos produtos de PCR das mini-prep dos clones selecionados para análise de expressão

4.10.2 Impressão dos produtos de PCR e hibridização com a sonda plasmidial OVERGO

Após verificação da qualidade dos produtos de PCR obtidos, estes foram impressos em 20 membranas, como descrito no 3.11.8.

Para verificação da homogeneidade dos produtos de PCR impressos nas membranas e posterior normalização, efetuou-se hibridização das membranas com a sonda plasmidial OVERGO. Das 20 membranas, seis foram escolhidas para as hibridizações com os alvos dos cinco tecidos por apresentarem-se mais homogêneas (membranas 13, 14, 15, 16, 18, 19 e 20 – Figura 25).

Figura 25 - Hibridização das membranas de número 13 (A), 14 (B), 16 (C), 18 (D), 19 (E) e 20 (F) com a sonda plasmidial OVERGO

4.10.3 Extração do RNA total dos cinco tecidos para construção dos alvos

Para construção dos alvos, 30 µg de RNA total de cada tecido: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo, sendo 10 µg de cada animal (*pool* de três animais por tecido), foram utilizados. Para verificação da integridade do RNA extraído, efetuou-se eletroforese em gel de agarose 1%, e para quantificação, realizou-se leitura do material em espectrofotômetro. A foto dos géis de agarose dos RNAs total utilizados para a construção dos 15 alvos (cinco alvos/tecidos para cada hibridização, sendo que foram efetuadas 3 hibridizações de cada alvo) encontra-se na figura 26.

4.10.4 Hibridizações das membranas com os alvos

Para avaliação da expressão dos genes correspondentes aos 144 clones impressos, foram efetuadas hibridizações de três membranas diferentes com cada alvo, escolhidas ao acaso (alvo 1 – hipófise; alvo 2 – hipotálamo; alvo 3 – cérebro; alvo 4 – fígado; alvo 5 – músculo):

<u>Hibridização 1</u>	<u>Hibridização 2</u>	<u>Hibridização 3</u>
Alvo 1 – Membrana 13	Alvo 1 – Membrana 19	Alvo 1 – Membrana 20
Alvo 2 – Membrana 14	Alvo 2 – Membrana 18	Alvo 2 – Membrana 19
Alvo 3 – Membrana 18	Alvo 3 – Membrana 14	Alvo 3 – Membrana 13
Alvo 4 – Membrana 19	Alvo 4 – Membrana 20	Alvo 4 – Membrana 18
Alvo 5 – Membrana 20	Alvo 5 – Membrana 13	Alvo 5 – Membrana 14

Pelo fato da hibridização do alvo 5 com a membrana 13 (hibridização 2) não ter ficado muito boa, este alvo foi hibridizado uma quarta vez com a membrana 16.

Na figura 27 estão representados os resultados obtidos destas hibridizações.

Figura 26 - Foto do gel de agarose 1% do RNA total extraído dos cinco tecidos: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo, utilizados para a construção dos alvos empregados nas hibridizações

Figura 27 - Resultados obtidos após hibridização das membranas com os cinco alvos: hipófise (A), hipotálamo (B), cérebro (C), músculo (D) e fígado (E)

4.10.5 Análise estatística – Genes diferencialmente expressos

4.10.5.1 Quantificação e normalização dos sinais dos *spots*

Para a obtenção do resultado de expressão dos genes correspondentes aos produtos de PCR impressos, as imagens obtidas por meio de STORM[®] *PhosphorImager* (GE Healthcare – Amersham Biosciences) foram digitalizadas, utilizando-se o *software ImageQuant* (GE Healthcare – Amersham Biosciences) e analisadas por meio do *software ArrayVision* (Imaging Research Inc.).

Esta análise foi iniciada com o endereçamento dos sinais, no intuito de identificar o clone correspondente a cada região da membrana. Para isto, “informou-se” ao programa as características referentes à geometria das membranas, tais como: número de linhas e colunas contendo *spots*, distância horizontal e vertical entre o centro dos *spots* e diâmetro destes. Para quantificação do sinal, efetuou-se uma distinção entre aqueles correspondentes aos alvos hibridizados (*spots*), daqueles oriundos do ruído de fundo (*background*). Sendo assim, estipularam-se valores para a intensidade destes sinais e realizou-se uma correção, com base no sinal do *background* (razão entre estes dois tipos de sinais).

A figura 28 ilustra o comportamento dos 144 genes representados pelos clones impressos, bem como a relação destes com o controle GAPDH, nos cinco tecidos estudados: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo. Embora a maior parte dos genes estudados tenha apresentado expressão bem abaixo à do GAPDH, alguns genes (GGEZHC1012B09.g, GGEZHC1018D07.g, GGEZHC1025B09.g, GGEZHC1013D08.g, GGEZHC1021G10.g, GGEZHC1025C02.g, GGEZHT1005B07.g, GGEZHT1006H03.g, GGEZHT1007F10.g, GGEZHT1016C11.g) apresentaram expressão similar, ou mesmo superior a este gene controle e não demonstraram diferença nos seus níveis de expressão nos diferentes tecidos. Esta observação sugere que estes genes possam se comportar como genes constitutivos, ou seja, genes envolvidos em funções básicas necessárias para a manutenção celular, que devido à presença de elementos promotores específicos, são expressos constitutivamente em todas as células dos organismos (Glare et al., 2002). Sendo assim, estes genes merecem ser melhor estudados, pois, embora a β -actina – proteína do citoesqueleto - e o GAPDH – enzima que participa da glicólise - sejam amplamente utilizados como controle positivo em experimentos de expressão gênica, há

trabalhos demonstrando que estes não são expressos de maneira constante (GLARE et al., 2002; BARBER et al., 2005).

Figura 28 - Comportamento dos 144 genes estudados, bem como a relação destes com o GAPDH, nos cinco tecidos: hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo

Após as normalizações com base nos sinais do OVERGO e do controle positivo GAPDH (item 3.14.1), os valores do sinal de cada *spot*, resultantes das diferentes hibridizações, foram empregados no modelo estatístico descrito no item 3.14.2.

4.10.5.2 Análise estatística

Dos 144 genes representados pelos clones impressos nas membranas, 78 apresentaram diferença no nível de expressão entre pelo menos dois tecidos de frangos da linhagem de corte comercial estudada, a 5% de probabilidade (Tabela 10). Das 10 comparações possíveis entre tecidos (tratamentos):

- hipófise x hipotálamo (T1);
- hipófise x cérebro (T2);
- hipófise x fígado (T3);
- hipófise x músculo (T4);
- hipotálamo x cérebro (T5);
- hipotálamo x fígado (T6);
- hipotálamo x músculo (T7);
- cérebro x fígado (T8);
- cérebro x músculo (T9);
- fígado x músculo (T10).

25 genes apresentaram-se diferencialmente expressos em apenas uma combinação, oito genes apresentaram expressão diferencial em duas combinações, nove genes em três combinações, 12 genes em quatro combinações, nove em cinco combinações, 10 em seis, quatro em sete e apenas um gene apresentou-se diferencialmente expresso em oito combinações (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continua)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHT1020C07.g	1	2,34	2,55	0,028797
GGEZHT1002B12.g	1	3,41	2,41	0,036564
GGEZHT1004C02.g	2	1,94	3,06	0,011985
GGEZHT1012D06.g	2	-2,88	-3,05	0,012076
GGEZHT1006E09.g	2	-2,02	-2,87	0,016336
GGEZHT1020C07.g	2	2,61	2,88	0,016481
GGEZHT1004D05.g	2	3,22	2,67	0,023616
GGEZHT1019D08.g	2	-2,21	-2,55	0,028439
GGEZHT1020F10.g	2	2,51	2,52	0,030387
GGEZHC1016H07.g	2	-2,14	-2,47	0,03252
GGEZHC1002D03.g	2	-4,58	-2,46	0,033257
GGEZHC1004D08.g	2	-3,34	-2,37	0,038692
GGEZHT1013A01.g	2	2,19	2,29	0,045244
GGEZHC1020B07.g	2	-1,65	-2,26	0,046401
GGEZHT1017G08.g	2	1,99	2,27	0,046705
GGEZHT1014A08.g	3	3,64	5,56	0,00024
GGEZHC1027B04.g	3	4,75	4,25	0,001691
GGEZHC1006G03.g	3	-3,49	-4,13	0,002015
GGEZHT1006E09.g	3	2,56	3,85	0,003217
GGEZHT1016B07.g	3	3,34	3,4	0,006745
GGEZHT1006C03.g	3	2,33	3,22	0,00924
GGEZHC1025G07.g	3	2,8	3,19	0,009733
GGEZHT1020F02.g	3	2,07	2,81	0,018589
GGEZHT1022A04.g	3	2,19	2,67	0,023311
GGEZHT1007B10.g	3	-2,51	-2,66	0,023431
GGEZHT1002B12.g	3	3,51	2,47	0,033116
GGEZHT1019D08.g	3	2,02	2,26	0,047018
GGEZHC1001H04.g	3	1,73	2,25	0,048264
GGEZHC1006G03.g	4	10,23	7,7	1,64E-05
GGEZHT1021G03.g	4	4,25	7,17	3,02E-05
GGEZHT1014A08.g	4	5,17	7,07	3,4E-05
GGEZHT1016B07.g	4	10,71	6,68	5,48E-05
GGEZHC1007B08.g	4	9,17	6,63	5,85E-05
GGEZHT1004A10.g	4	-6,82	-6,1	0,000115
GGEZHC1016H07.g	4	5,9	5,8	0,000174
GGEZHT1004C02.g	4	-3,34	-5,59	0,000229

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continuação)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHT1018G11.g	4	3,19	5,26	0,00037
GGEZHC1027B04.g	4	6,45	5,08	0,000474
GGEZHT1006E09.g	4	3,24	4,8	0,000722
GGEZHT1004B05.g	4	-10,64	-4,75	0,000765
GGEZHT1006C03.g	4	3,5	4,76	0,000767
GGEZHT1019D06.g	4	3,21	4,71	0,000825
GGEZHC1026G07.g	4	4,71	4,69	0,000855
GGEZHT1002C12.g	4	-3,06	-4,45	0,001208
GGEZHC1021F11.g	4	-12,46	-4,09	0,002153
GGEZHC1013C08.g	4	-6,75	-3,94	0,00271
GGEZHT1020F02.g	4	2,77	3,92	0,002852
GGEZHC1019C09.g	4	5,8	3,84	0,003239
GGEZHT1003C05.g	4	-4,24	-3,82	0,003316
GGEZHT1003D10.g	4	-4,54	-3,77	0,003603
GGEZHC1014D08.g	4	-2,4	-3,76	0,003649
GGEZHC1021D09.g	4	-13,15	-3,69	0,004113
GGEZHT1007E04.g	4	4,65	3,68	0,004245
GGEZHC1001H04.g	4	2,4	3,57	0,005083
GGEZHT1005G06.g	4	3,17	3,38	0,007061
GGEZHT1014C05.g	4	3,05	3,34	0,00746
GGEZHC1020D02.g	4	4,34	3,29	0,008099
GGEZHC1025H09.g	4	4,23	3,19	0,009617
GGEZHC1020B07.g	4	1,94	2,99	0,013531
GGEZHC1025D09.g	4	-5,12	-2,9	0,015694
GGEZHC1025D06.g	4	-5,78	-2,87	0,01634
GGEZHT1020C07.g	4	2,54	2,79	0,019196
GGEZHT1007B10.g	4	2,6	2,77	0,019761
GGEZHC1001D09.g	4	1,55	2,65	0,024376
GGEZHC1011G05.g	4	-2,58	-2,61	0,025544
GGEZHC1021B02.g	4	-2,67	-2,61	0,025658
GGEZHC1021B03.g	4	-5,22	-2,6	0,026152
GGEZHC1003H08.g	4	2,97	2,52	0,030636
GGEZHC1012G11.g	4	-4,23	-2,46	0,032993
GGEZHT1022A04.g	4	2,06	2,47	0,033326
GGEZHC1015F08.g	4	1,83	2,46	0,033488
GGEZHC1024E08.g	4	3,51	2,45	0,03433

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continuação)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHT1006A12.g	4	3,1	2,44	0,034825
GGEZHC1018E01.g	4	-4,83	-2,4	0,036418
GGEZHT1014B04.g	4	1,53	2,41	0,036676
GGEZHC1018C11.g	4	-5,92	-2,39	0,03712
GGEZHT1017G08.g	4	2,05	2,37	0,03929
GGEZHC1019A01.g	4	-3,7	-2,36	0,039454
GGEZHC1023G12.g	4	2,83	2,35	0,04089
GGEZHC1005C09.g	4	-4,2	-2,33	0,041062
GGEZHT1017C11.g	4	2,11	2,34	0,041244
GGEZHC1020F06.g	4	2,72	2,33	0,041932
GGEZHC1005D02.g	4	-4,17	-2,31	0,042901
GGEZHC1022C08.g	4	-1,6	-2,23	0,048784
GGEZHC1012B11.g	4	-4,46	-2,23	0,049053
GGEZHT1012D06.g	5	-3,15	-3,3	0,007887
GGEZHT1002B12.g	5	-3,92	-2,67	0,022946
GGEZHC1002D03.g	5	-4,56	-2,45	0,033476
GGEZHT1006E09.g	5	-1,82	-2,44	0,034341
GGEZHT1019D08.g	5	-2,01	-2,25	0,047201
GGEZHT1014A08.g	6	3,33	5,18	0,000413
GGEZHC1027B04.g	6	5,21	4,5	0,001138
GGEZHT1006E09.g	6	2,85	4,28	0,001605
GGEZHT1016B07.g	6	4,01	3,91	0,002908
GGEZHC1025G07.g	6	3,33	3,72	0,003997
GGEZHT1006C03.g	6	2,62	3,66	0,004392
GGEZHC1006G03.g	6	-2,57	-3,12	0,010661
GGEZHT1007B10.g	6	-2,84	-3,01	0,012803
GGEZHT1020F02.g	6	2,16	2,96	0,014317
GGEZHC1004D08.g	6	4,47	2,96	0,014409
GGEZHT1020F10.g	6	-2,72	-2,73	0,020995
GGEZHC1019C09.g	6	3,35	2,64	0,024714
GGEZHC1026G07.g	6	2,36	2,59	0,02685
GGEZHT1019D08.g	6	2,21	2,56	0,028327
GGEZHT1020C07.g	6	-2,33	-2,53	0,029576
GGEZHT1018G11.g	6	-1,69	-2,37	0,038407
GGEZHT1002C12.g	6	1,78	2,31	0,043828
GGEZHT1004C02.g	6	-1,62	-2,23	0,048968

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continuação)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHC1006G03.g	7	13,87	8,71	5,56E-06
GGEZHC1007B08.g	7	14,1	7,92	1,29E-05
GGEZHT1016B07.g	7	12,83	7,19	2,96E-05
GGEZHT1004C02.g	7	-4,29	-6,74	5,02E-05
GGEZHT1014A08.g	7	4,73	6,69	5,42E-05
GGEZHT1021G03.g	7	3,8	6,62	5,95E-05
GGEZHC1016H07.g	7	7,43	6,55	6,45E-05
GGEZHT1004A10.g	7	-5,82	-5,59	0,000228
GGEZHC1027B04.g	7	7,08	5,34	0,000329
GGEZHC1019C09.g	7	10,97	5,24	0,000381
GGEZHT1006E09.g	7	3,6	5,23	0,000382
GGEZHT1006C03.g	7	3,94	5,21	0,000398
GGEZHC1026G07.g	7	5,56	5,19	0,000406
GGEZHT1020F02.g	7	2,88	4,08	0,00223
GGEZHT1018G11.g	7	2,45	4,06	0,00228
GGEZHC1025H09.g	7	5,82	3,9	0,002964
GGEZHC1020B07.g	7	2,3	3,77	0,003645
GGEZHT1002C12.g	7	-2,48	-3,62	0,004618
GGEZHT1019D06.g	7	2,42	3,56	0,00517
GGEZHT1005G06.g	7	3,37	3,55	0,005269
GGEZHC1015F08.g	7	2,38	3,54	0,005377
GGEZHT1004B05.g	7	-5,78	-3,52	0,00541
GGEZHC1001H04.g	7	2,17	3,17	0,009957
GGEZHC1004D08.g	7	4,76	3,08	0,011715
GGEZHT1007E04.g	7	3,43	2,95	0,014457
GGEZHC1021F11.g	7	-5,55	-2,77	0,019287
GGEZHC1023D05.g	7	2,48	2,68	0,023281
GGEZHC1013C08.g	7	-3,6	-2,64	0,024167
GGEZHC1001D09.g	7	1,52	2,52	0,030512
GGEZHC1013D09.g	7	-1,96	-2,48	0,031861
GGEZHT1007B10.g	7	2,3	2,42	0,03618
GGEZHT1019D08.g	7	2,09	2,39	0,038053
GGEZHT1003D10.g	7	-2,58	-2,35	0,03973
GGEZHC1022C08.g	7	-1,63	-2,31	0,042447
GGEZHC1021D09.g	7	-5,03	-2,31	0,042749
GGEZHT1010H07.g	7	1,72	2,32	0,042989

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continuação)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHC1025G07.g	7	2,08	2,27	0,046791
GGEZHC1014D08.g	7	-1,69	-2,25	0,04708
GGEZHT1014A08.g	8	5,54	7,37	2,4E-05
GGEZHT1006E09.g	8	5,19	6,73	5,16E-05
GGEZHC1027B04.g	8	8,95	5,98	0,000136
GGEZHT1019D08.g	8	4,45	4,82	0,000699
GGEZHT1016B07.g	8	5,32	4,71	0,000826
GGEZHT1012D06.g	8	5,09	4,7	0,000843
GGEZHT1006C03.g	8	3,12	4,33	0,001499
GGEZHT1004C02.g	8	-2,45	-4,14	0,00199
GGEZHC1025G07.g	8	3,71	4,05	0,002327
GGEZHC1001H04.g	8	2,58	3,87	0,003102
GGEZHC1026G07.g	8	3,35	3,66	0,004398
GGEZHC1004D08.g	8	6,31	3,63	0,004593
GGEZHC1020B07.g	8	2,12	3,39	0,006886
GGEZHT1020F02.g	8	2,38	3,34	0,007432
GGEZHT1020F10.g	8	-3,39	-3,33	0,007501
GGEZHC1016H07.g	8	2,53	3,03	0,012573
GGEZHT1004A10.g	8	-2,54	-2,95	0,014299
GGEZHT1020C07.g	8	-2,6	-2,85	0,016926
GGEZHC1023D05.g	8	2,56	2,76	0,019987
GGEZHC1007B08.g	8	2,51	2,75	0,020455
GGEZHT1002B12.g	8	4,03	2,74	0,020776
GGEZHC1019C09.g	8	3,24	2,57	0,027771
GGEZHC1015F08.g	8	1,85	2,53	0,030082
GGEZHT1021G03.g	8	1,65	2,47	0,033153
GGEZHT1022A04.g	8	2,03	2,41	0,036399
GGEZHC1005A11.g	8	-3,1	-2,4	0,036941
GGEZHC1022C08.g	8	1,65	2,38	0,038343
GGEZHT1004B05.g	8	-3,22	-2,35	0,040097
GGEZHT1007B10.g	8	-2,24	-2,33	0,041251
GGEZHT1018G11.g	8	-1,67	-2,31	0,042805
GGEZHT1023G03.g	8	-3,86	-2,27	0,045603
GGEZHC1006G03.g	9	18,38	9,64	2,22E-06
GGEZHT1014A08.g	9	7,87	8,88	4,66E-06
GGEZHT1004C02.g	9	-6,47	-8,65	5,85E-06

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continuação)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHC1007B08.g	9	16,86	8,45	7,26E-06
GGEZHC1016H07.g	9	12,6	8,28	8,73E-06
GGEZHT1016B07.g	9	17,05	7,99	1,19E-05
GGEZHT1021G03.g	9	4,93	7,91	1,3E-05
GGEZHT1006E09.g	9	6,55	7,68	1,67E-05
GGEZHT1004A10.g	9	-10,88	-7,58	1,87E-05
GGEZHC1027B04.g	9	12,16	6,81	4,66E-05
GGEZHC1026G07.g	9	7,92	6,26	9,4E-05
GGEZHT1006C03.g	9	4,69	5,87	0,000157
GGEZHT1004B05.g	9	-14,15	-5,33	0,00033
GGEZHC1020B07.g	9	3,2	5,26	0,000366
GGEZHC1001H04.g	9	3,57	5,19	0,000405
GGEZHC1019C09.g	9	10,63	5,17	0,00042
GGEZHT1002C12.g	9	-3,46	-4,94	0,000578
GGEZHT1019D06.g	9	3,21	4,7	0,000835
GGEZHT1019D08.g	9	4,22	4,65	0,000907
GGEZHT1020F02.g	9	3,18	4,46	0,001214
GGEZHC1015F08.g	9	2,89	4,34	0,001461
GGEZHT1005G06.g	9	4,23	4,21	0,001787
GGEZHT1018G11.g	9	2,48	4,13	0,002059
GGEZHT1012D06.g	9	4,14	4,1	0,002131
GGEZHT1003D10.g	9	-4,83	-3,92	0,002801
GGEZHT1003C05.g	9	-4,19	-3,79	0,003479
GGEZHC1004D08.g	9	6,7	3,75	0,003761
GGEZHC1021F11.g	9	-10,05	-3,74	0,003787
GGEZHC1025H09.g	9	5,3	3,69	0,004147
GGEZHC1021D09.g	9	-12,03	-3,56	0,005075
GGEZHC1023D05.g	9	3	3,23	0,008984
GGEZHT1007B10.g	9	2,91	3,1	0,011231
GGEZHC1001D09.g	9	1,63	2,96	0,014338
GGEZHC1013C08.g	9	-3,98	-2,85	0,016862
GGEZHC1020G09.g	9	-4,44	-2,85	0,017002
GGEZHT1014C05.g	9	2,54	2,8	0,018744
GGEZHT1007E04.g	9	3,07	2,68	0,022941
GGEZHT1004A04.g	9	-7,1	-2,64	0,024285
GGEZHC1025G07.g	9	2,32	2,6	0,026508

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(continuação)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHC1020D02.g	9	3,17	2,59	0,026872
GGEZHC1023B07.g	9	2,37	2,55	0,028691
GGEZHT1010H07.g	9	1,81	2,55	0,028812
GGEZHC1012B11.g	9	-5	-2,4	0,036767
GGEZHC1021B02.g	9	-2,44	-2,37	0,038547
GGEZHC1024B07.g	9	-2,34	-2,34	0,040778
GGEZHC1008G07.g	9	5,7	2,34	0,041502
GGEZHC1019G03.g	9	2,49	2,33	0,042073
GGEZHC1014D08.g	9	-1,7	-2,27	0,045938
GGEZHC1021B03.g	9	-4,21	-2,26	0,046774
GGEZHC1006G03.g	10	35,72	11,84	3,31E-07
GGEZHT1018G11.g	10	4,14	6,44	7,4E-05
GGEZHT1002C12.g	10	-4,43	-5,92	0,000144
GGEZHC1007B08.g	10	6,72	5,7	0,000198
GGEZHT1007B10.g	10	6,53	5,44	0,000284
GGEZHT1021G03.g	10	3	5,44	0,000286
GGEZHC1016H07.g	10	4,97	5,24	0,000378
GGEZHT1004A10.g	10	-4,29	-4,62	0,000938
GGEZHT1004C02.g	10	-2,65	-4,5	0,001121
GGEZHT1003C05.g	10	-4,36	-3,9	0,002936
GGEZHT1003D10.g	10	-4,41	-3,7	0,004058
GGEZHC1001D09.g	10	1,8	3,55	0,00531
GGEZHT1019D06.g	10	2,4	3,54	0,005338
GGEZHC1022C08.g	10	-2,05	-3,4	0,006667
GGEZHC1021B02.g	10	-3,48	-3,32	0,007674
GGEZHT1016B07.g	10	3,2	3,28	0,008289
GGEZHT1014C05.g	10	2,76	3,05	0,012356
GGEZHC1011G05.g	10	-2,96	-2,99	0,013341
GGEZHT1004B05.g	10	-4,39	-2,97	0,013837
GGEZHT1020C07.g	10	2,52	2,77	0,019716
GGEZHT1007E04.g	10	3,08	2,69	0,022515
GGEZHT1020F10.g	10	2,65	2,67	0,023424
GGEZHT1016A07.g	10	4,91	2,66	0,023831
GGEZHC1026G07.g	10	2,36	2,6	0,026501
GGEZHC1019C09.g	10	3,28	2,6	0,026689
GGEZHC1020G09.g	10	-3,8	-2,55	0,028299

Tabela 10 - Valores absolutos da diferença de expressão e probabilidade, dos 78 genes que apresentaram nível de expressão diferenciado entre pelo menos dois tecidos. As comparações (T) consistem em: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

(conclusão)

Clone	T	Diferença absoluta	tValue	Probt
GGEZHC1025H09.g	10	3,15	2,54	0,029254
GGEZHC1023B07.g	10	2,3	2,47	0,033372
GGEZHT1017G08.g	10	2,01	2,3	0,044119
GGEZHT1005G06.g	10	2,18	2,28	0,045834
GGEZHC1014D08.g	10	-1,68	-2,22	0,049964

Comparando-se a expressão dos genes na hipófise e hipotálamo (T1) de aves de 21 dias de idade de uma linhagem de corte comercial, os dois que apresentaram diferença na sua expressão foram mais expressos na hipófise (Figura 29). Já na comparação entre hipófise e cérebro (T2), seis genes foram mais expressos na hipófise e sete no cérebro, totalizando 13 genes diferencialmente expressos. Dos 13 genes diferencialmente expressos na comparação entre hipófise e fígado (T3), 11 foram mais expressos na hipófise e dois foram mais expressos no fígado. Comparando-se hipófise e músculo (T4), 34 genes foram mais expressos na hipófise e 24 foram mais expressos no músculo, totalizando 58 genes diferencialmente expressos. Os cinco genes que apresentaram diferença de expressão entre hipotálamo e cérebro (T5) foram mais expressos no cérebro. Dos 18 genes diferencialmente expressos entre hipotálamo e fígado (T6), 12 foram mais expressos no hipotálamo e seis no fígado. Comparando-se hipotálamo e músculo (T7), 27 genes foram mais expressos no hipotálamo e 12 no músculo, totalizando 39 genes diferencialmente expressos. Dos 31 genes diferencialmente expressos na comparação entre cérebro e fígado (T8), 22 foram mais expressos no cérebro e nove no fígado. Já na comparação entre cérebro e músculo (T9), dos 50 genes diferencialmente expressos, 33 foram mais expressos no cérebro e 17 no músculo. E, finalmente, comparando-se a expressão dos 144 genes no fígado e músculo (T10), 20 foram mais expressos no fígado e 11 no músculo, totalizando 31 genes diferencialmente expressos.

Figura 29 - Diferença na expressão dos 78 genes, comparando-se: T1 - hipófise x hipotálamo; T2 - hipófise x cérebro; T3 - hipófise x fígado; T4 - hipófise x músculo; T5 - hipotálamo x cérebro; T6 - hipotálamo x fígado; T7 - hipotálamo x músculo; T8 - cérebro x fígado; T9 - cérebro x músculo; T10 - fígado x músculo

Os resultados desta segunda parte do projeto devem ser validados por meio de métodos mais controlados e precisos para se avaliar a expressão gênica, como a técnica de RT-PCR em tempo real, pois podem ser de grande utilidade para futuros estudos na área da genômica funcional. Não só a identificação e posterior estudo destes possíveis genes novos - o que poderia contribuir para a compreensão das bases moleculares envolvidas na expressão das características fenotípicas observadas entre linhagens selecionadas para diferentes traços - mas também a

consolidação de alguns genes como sendo constitutivos e passíveis de serem utilizados como controle positivo em estudos de expressão gênica são informações valiosas, uma vez que a importância de se utilizar um gene que realmente apresente expressão constante é um ponto que vem sendo bastante discutido.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste projeto possibilitou a identificação de 4.286 ESTs (3.074 seqüências únicas), correspondendo a 2.133 ESTs da biblioteca HT1 (1.643 seqüências únicas) e 2.153 ESTs da biblioteca HC1 (1.649 seqüências únicas).

Observou-se uma distribuição similar das ESTs das bibliotecas HC1 e HT1 entre os termos do GO.

Dos 389 *contigs* obtidos após montagem das seqüências de ambas as bibliotecas, 194 apresentaram diferença no padrão de expressão de genes correspondentes, sendo que as seqüências de 102 *contigs* foram mais observadas na biblioteca HC1 e de 92 na biblioteca HT1.

Um total de 28 *contigs* continha SNPs linhagem específicos, sendo 52 SNPs TT específicos e 25 CC específicos. Estes resultados representam poderosas ferramentas que, após estudos mais específicos, como a análise de genes candidatos, podem ser utilizadas em futuros programas de seleção e melhoramento animal.

Das 146 ESTs que não puderam ter sua identidade revelada, 133 foram localizadas no genoma da galinha e apresentaram pelo menos uma fase de leitura aberta (ORF) e, por este motivo, podem corresponder a genes ou produtos gênicos ainda não identificados ou publicados.

Após análise de expressão, 78 seqüências foram confirmadas como sendo transcritos, uma vez que os genes correspondentes foram diferencialmente expressos entre pelo menos dois tecidos de frangos de corte comerciais (hipófise, hipotálamo, cérebro, fígado e músculo). Já, 10 genes apresentaram expressão similar à do GAPDH, não diferindo nos tecidos estudados, parecendo se comportar como genes constitutivos. Estes resultados devem ser validados por RT-PCR quantitativo ou *northern blot*, pois tanto os 78 genes que apresentaram expressão diferencial entre os tecidos, quanto aqueles 10 que parecem corresponder a genes constitutivos poderão conferir informações valiosas na área da genômica.

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**, Woodbury, v. 10, n. 12, p. 2062-2069, Dec. 2000.

ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, 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, p. 1651-1656, Jun. 1991.

AIRES, M.M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 934 p.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990. (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>).

ALVES, H.J. **Identificação e caracterização de seqüências expressas (ESTs) 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.

ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSKI, K.; DWIGT, S.; EPPIG, J.T.; HARRIS, M.A.; HILL, D.P.; ISSELTARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J.C.; RICHARDSON, J.E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G.M.; SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nature Genetics**, New York, v. 25, n. 1, 25-29, May 2000.

AUDIC, S.; CLAVERIE, J. The significance of digital gene expression profiles. **Genome Research**, Woodbury, v. 7, n. 10, p. 986-995, Oct. 1997. (Disponível em: <<http://igs-server.cnrs-mrs.fr>>).

BARBER, R.D.; HARMER, D.W.; COLEMAN, R.A.; CLARK, B.J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression panel of 72 human tissues. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 21, p. 389-395, May 2005.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C.; DE ROSA JUNIOR, V.; NOGUEIRA, F.; FERRO, J.; DI MAURO, S.; MENOSSE, M.; ULIAN, E.; SILVA-FILHO, M. A novel system for large-scale gene expression analysis: bacterial colonies array. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 6, p.963-969, Mar. 2006.

BAILEY, D.J.; HERBERT, J. Impaired copulatory behavior of male rats with hyperprolactinemia induced by domperidone or pituitary grafts. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 35, p. 186-193, 1982.

BERNARD, K.; AUPHAN, N.; GRANJEAUD, S.; VICTORERO, G.; SCHMITT-VERHULST, A.M.; JORDAN, B.R.; NGUYEN, C. Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 24, p. 1435-1443, Apr. 1996.

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, Nov. 2002. (Disponível em: <<http://www.chick.umist.ac.uk>>).

BORNEUF, E.; HÉRAULT, F.; CHICAULT, C.; CARRE, W.; ASSAF, S.; MONNIER, A.; MOTTIER, S.; LAGARRIGUE, S.; DOUAIRE, M.; MOSSER, J.; DIOT, C. Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. **Gene**, Amsterdam, v. 372, p. 162-170, May 2006.

BRIDGES, R.S.; NUMAM, M.; RONSHEIM, P.M.; MANN, P.E.; LUPINI, C.E. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated nulliparous female rats. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 8003-8007, Oct. 1990.

BULFIELD, G. Poultry breeding in the post-genomics era. **British Poultry Science**, London, v. 45, n. 1, p. 5-8, Feb. 2004.

BUNTIN, J.D.; LEA, R.W.; FIGGE, G.R. Reductions in plasma LH concentration and testicular weight in ring doves following intracranial injection of prolactin and growth hormone. **Journal of Endocrinology**, London, v. 118, p. 33-40, 1988.

BURNSIDE, J.; LIOU, S.S.; ZHONG, C.; COGBURN, L.A. Abnormal growth hormone receptor gene expression in the sex-linked dwarf chicken. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 88, n. 1, p. 20-28, Oct. 1992.

BURNSIDE, J.; NEIMAN, P.; TANG, J.S.; BASOM, R.; TALBOT, R.; ARONSAJN, M.; BURT, D.; DELROW, J. Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis. **BMC genomics**, London, v. 6, p. 13-17, Feb. 2005.

BURT, D.W. The chicken genome and the developmental biologist. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 121, n. 9, p. 1129-1135, Sept. 2004.

BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Factors controlling and influencing growth hormone pulsatility in broiler chickens. In: FISHER, C.; MORRIS, T.R. (Ed.). EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 9., 1994. **Proceedings...** Darvel: Walker and Connel, 1994. p. 308-3111.

BUYSE, J.; VANDERPOOTEN, A.; LECLERCQ, B.; BERGHMAN, L.R.; DECUYPERE, E. Pulsatility of plasma growth hormone and hepatic growth hormone receptor characteristics of broiler chickens divergently selected for abdominal fat content. **British Poultry Science**, London, v. 35, n. 1, p. 145-152, Mar. 1994.

CALVET, J.P. Molecular approaches for analyzing differential gene expression: differential cDNA library construction and screening. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 5, n. 6, p. 751-757, Nov. 1991.

CARRE, W.; DIOT, C.; FILLON, V.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; LAGARRIGUE, S.; MORRISSON, M.; VIGNAL, A.; GROENEN, M.A.M.; DOUAIRE, M. Development of 112 unique expressed sequence tags from chicken liver using an arbitrarily primed reverse transcriptase-polymerase chain reaction and single strand conformation gel purification method. **Animal Genetics**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 289-297, Oct. 2001.

CHAVES, L.D.; ROWE, J.A.; REED, K.M. Survey of a cDNA library from the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 1, p. 12-17, Jan. 2005.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, n. 1, p. 156-159, Apr. 1987.

CHUANG, S.E.; DANIELS, D.L.; BLATTNER, F.R. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 175, p. 2026-2036, Apr. 1993.

COGBURN, L.A.; WANG, X.; CARRE, W.; REJTO, L.; PORTER, T.E.; AGGREY, S.E.; SIMON, J. Systems-wide chicken DNA microarrays, gene expression profiling, and discovery of Functional genes. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 939-951, Jun. 2003.

COX, J.M. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 250, p. 3-13, Apr. 2001.

CROSS, T.G.; SCHEEL-TOELLNER, D.; HENRIQUEZ, N.V.; DEACON, E.; SALMON, M.; LORD, J.M. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 34-41, Apr. 2000.

CUNNINGHAM, B.C.; ULTSCH, M.; DE VOS, A.M.; MULKERRIN, M.G.; CLAUSER, K.R.; WELLS, J.A. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. **Science**, Washington, v. 254, n. 5033, p. 821-825, Nov. 1991.

CZECH, M.P. Structures and functions of the receptors for insulin and insulin-like growth factors. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 63, suppl.2, p. 27, 1986.

DECUYPERE, E.; LEENSTR, F. R.; BUYSE, J.; BEUVING, G.; BERGHMAN, L. Temporal secretory patterns of growth hormone in male meat-type chickens selected for body weight gain or food conversion. **British Poultry Science**, London, v. 32, p. 1121-1128, Dec. 1991.

DRAGO, F.; CANONICO, P.L.; BITETTI, R.; SCAPAGNINI, U. Systemic and intraventricular prolactin induces excessive grooming. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 65, n. 4, p. 451-458, Aug. 1980.

DRANCHAK, P.K.; CHAVES, L.D.; ROWE, J.A.; REED, K.M. Turkey microsatellite loci from an embryonic cDNA library. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, n. 4, p. 526-531, apr. 2003.

DUCLOS, M.J.; BACCAVIN, C.; SIMON, J. Genetic models for the study of insulin-like growth factor (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. **Domestic Animal Endocrinology**, Aubur, v. 17, n. 3, p. 231-243, Oct. 1999.

DUKES, H.H. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 363 p.

ELLEGREN, H. The avian genome uncovered. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 180-186, Apr. 2005.

ENSEMBL. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Multi/blastview?species=Gallus_gallus>. Acesso em 2006.

EVANS, H.M.; LONG, J.A. The effect of the anterior lobe of the hypophysis administered intraperitoneally on growth, maturity and the estrous cycles of the rat. **The Anatomical Record**, Philadelphia, v. 21, p. 61-63, 1921.

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

GLARE, E.M.; DIVJAK, M.; BAILEY, M.J.; WALTERS, E.H. β -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. **Thorax**, London, v. 57, p. 765-770, Dec. 2002.

GONZALVES, E.; ROBERTO, J. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALVES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNESP/UNESP, 2002. cap. 21, p. 279-278.

GREEN, P. 1993. *Cross_match*. Disponível em:
<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysis_tools/phrap.htm>. Acesso em: 2006.

GREULICH, H.; ERIKSON, R.L. An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 21, p. 13280-13288, May 1998.

HANSEN, L.H.; MADSEN B.; TEISNER B.; NIELSEN, J.H.; BILLESTRUP, N. Characterization of the inhibitory effect of growth hormone on primary preadipocyte differentiation. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 12, n. 8, p. 1140-1149, Aug. 1998.

HARLAN, R.E.; SHIVERS, B.D.; PFAFF, D.W. Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen dependent behaviour, lordosis. **Science**, Washington, v. 219, p. 1451-1453, Mar. 1983.

HATEY, F.; TOSSER-KLOPP, G.; CLOUSCARD-MARTINATO, M.; MULSANT, P.; GASSER, F. Expressed sequence tags for genes: a review. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 30, n. 6, p. 521-541, Nov. 1998.

HORIBA, N.; MASUDA, S.; TAKEUCHI, A.; SAITO, H.; OKUDA, M.; INUI, K. Gene expression variance based on random sequencing in rat remnant kidney. **Kidney International**, New York, v. 66, n. 1, p. 29-45, Jul. 2004.

HUANG, X.; MADAN, A. Cap3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, n. 9, p. 868-877, Sep. 1999.

IMAGING RESEARCH INC. Disponível em: <<http://www.imagingresearch.com>>. Acesso em: 2006.

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, London, v. 432, p. 695-716, Dec. 2004.

INSTITUTO BEIJING DE GENÔMICA DA ACADEMIA CHINESA DE CIÊNCIAS. Disponível em: <<http://english.cas.ac.cn/Eng2003/page/home.asp>>. Acesso em: 2006.

JORGE, E.C.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; ALVES, H.J.; SILVA, C.S.; BALAN, R.G.; PATRICIO, M.; COUTINHO, L.L. EST analysis of mRNAs expressed during embryogenesis in *Gallus gallus*. **International Journal of Developmental Biology**, Leoa, v. 48, n. 4, p. 333-337, Jun. 2004.

KA, S.J.; FITZSIMMONS, C.; JACOBSSON, L.; SAVOLAINEN, P.; LUNDEBERG, J.; SIEGEL, P.B.; ANDERSSON, L.; HALLBOOK, F. Expression analysis of growth and energy regulation – Associated genes in two divergent chicken strains. **Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology Annals os the New York Academy os Sciences**, New York, v. 1040, p. 357-359, Apr. 2005.

KHAN, J.; BITTNER, M.L.; CHEN, Y.; MELTZER, P.S.; TRENT, J.M. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1423, p. M17-M28, Mar. 1999.

KIN, H.; SCHMIDT, C.J.; DECKER, K.S.; EMARA, M.G. A double-screening method to identify reliable candidate non-synonymous SNPs for chicken EST data. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 249-254, Aug. 2003.

KLEINHOLZ, L.H.; RAHN, H. The distribution of intermedin in the pars anterior of the chicken pituitary. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 25, p.145-147, Mar. 1940.

LAGARRIGUE, S.; PITEL, F; CARRE, W.; ABASHT, B.; LE ROY, P.; NEAU, A.; AMIGUES, Y.; SOURDIOX, M.; SIMON, J.; COGBURN, L.; AGGREY, S.; LECLERCQ, B.; VIGNAL, A.; DOUAIRE, M. Mapping quantitative trait loci affecting fffatness and breast muscle weight in meat-type chicken lines divergently selected on abdominal fatness. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 38, n. 1, p. 85-97, Feb. 2006.

LEPHART, E.D.; LUND, T.D.; HORVATH, T.L. Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 37, p. 25-37, Nov. 2001.

LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS, C.T.J. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 16, p. 143-163, Apr. 1995.

LENNON, G.; LEHRACH, H. Hybridization analysis of arrayed cDNA libraries. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 7, p. 314-317, 1991.

LI, C.H.; KELLY, P.A.; BUNTIN, J.D. Inhibitory effects of anti-prolactin receptor antibodies on prolactin binding in the brain and prolactin-induced feeding behavior in ring doves. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 61, p. 125-135, Feb. 1995.

LI, C.H.; EVANS, H.M. The isolation of pituitary growth hormone. **Science**, Washington, v. 99, n. 2566, p. 183-184, 1944.

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

MACKENZIE, S.J.; YARWOOD S.J.; PEDEN A.H.; BOLGER, G.B.; VERNON, R.G.; HOUSLAY, M.D. Stimulation of p70S6 kinase via a growth hormone-controlled phosphatidylinositol 3-kinase pathway leads to the activation of a PDE4A cyclic AMP-specific phosphodiesterase in 3T3-F442A preadipocytes. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3549-3554, Mar. 1998.

MARRA, M.A.; HILLIER, L.; WATERSTON, R.H. Expressed sequence tags – ESTablishing bridges between genomes. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 14, p. 4-7, 1998.

MAXAN, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 560-564, Feb. 1977.

MIN, W.G.; LILLEHOJ, H.S.; ASHWELL, C.M.; VAN TASSEL, C.P.; DALLOUL, R.A.; MATUKUMALLI, L.K.; HAN, J.Y.; LILLEHOJ, E.P. Expressed sequence tag analysis of Eimeria-stimulated intestinal intraepithelial lymphocytes in chickens. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 30, n. 2, p. 143-149, Jun. 2005.

MOORE, B.J.; GERARDO-GETTENS, T.; HOROWITZ, B.A.; STERN, J.S. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. **Brain Research Bulletin**, Elmsford, v. 17, p. 563-569, Oct. 1986.

MUNTZ, K.H.; STERNWEIS, P.C.; GILMAN, A.G.; MUMBY, S.M. Influence of γ subunit prenylation on association of guanine nucleotide-binding regulatory proteins with membranes. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 3, n. 1, p. 49-61, Jan. 1992.

ORFS. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>>. Acesso em: 2006.

NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>>. Acesso em: 2006a.

NCBI. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=protein&cmd=search&term=gi%7C1170039%7Csp%7CP46412%7CGPX3_MOUSE>. Acesso em: 2006b.

NIZETIC, D.; ZEHETNER, G.; MONACO, A.P.; GELLEN, L.; YOUNG, B.D.; LEHRACH, H. Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 88, p. 3233-3237, Apr. 1991.

NOGUEIRA, F.T.S.; DE ROSA JUNIOR, V.E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1811-1824, Jul. 2003.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**, 2nd ed., San Diego, Academic Press, 1997. 806 p.

OKUBO, K.; HORRI, N.; MATOBA, R.; NIIYAMA, T.; FUKUSHIMA, A.; KOJIMA, Y.; MATSUMARA, K. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nature Genetics**, New York, v. 2, p. 173-179, Nov. 1992.

OKUBO, K.; ITOH, K.; FUKUSHIMA, A.; YOSHII, J.; MATSUBARA, K. Monitoring cell physiology by expression profiles and discovering cell type-specific genes by compiled expression profiles. **Genomics**, Orlando, v. 30, n. 2, p. 178-186, Nov. 1995.

PASSOS, G.A.S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto transcriptoma: análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 12, p. 34-37, Jan. 2000.

REED, K.M.; KNUTSON, T.P.; KRUETH, S.B.; SULLIVAN, L.R.; CHAVES, L.D. In silico mapping of ESTs from the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Animal Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 81-102, 2005.

ROKY, R.; VALATX, J.L.; PAUT-PANGO, L. Hypotalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle. **Physiology & Behavior**, New York, v. 55, n. 6, p. 1015-1019, Jun. 1994.

ROSSELOT, G.; MCMURTRY, J.P.; VASILATOS-YOUNKEN, R.; CZERWINSKI, S. Effect of exogenous growth hormone (cGH) administration on insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression in domestic fowl. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 114, p. 157-166, Oct. 1995.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, Dec. 1977.

SARKAR, D.; YEN, S.S.C. Hyperprolactinemia decrease the luteinizing hormone releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: A possible role for beta endorphin as a mediator. **Endocrinology**, Springfield, v. 116, p. 2082-2084, 1985.

SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, K.; AMAGAI, M.; KUWATA, C.; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signalling pathways. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, n. 4, p. 153-161, Aug. 2001.

SAVOLAINEN, P.; FITZSIMMONS, C.; ARVESTAD, L.; ANDERSSON, L.; LUNDEBERG, J. ESTs from the brain and testis of White Leghorn and red junglefowl: annotation, bioinformatic classification of unknown transcripts and analysis of expression levels. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 111, n. 1, p. 79-87, 2005.

SCHUMMER, M.; NG, W.V.; BUMGARNER, R.E.; NELSON, P.S.; SCHIMMER, B.; BEDNARSKI, D.W.; HASELL, L.; BALDWIN, R.L.; KARLAN, B.Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Amsterdam, v. 238, p. 375-385, Oct. 1999.

SHEPHERD, G.M.G.; POLOGRUTO, T.A.; SVOBODA, K. Circuit analysis of experience-dependent plasticity in the developing rat barrel cortex. **Neuron**, Cambridge, v. 38, n. 2, p. 277-289, Apr. 2003.

SMIT, L.S.; MEYER, D.J.; ARGETSINGER, L.S.; SCHWATZ, J.; CARTER-SU, C. Molecular events in growth hormone-receptor interaction and signaling. In KOSTYO, J.L. **Handbook of Physiology**. Oxford University Press, 1999. v. 5, p. 445-480.

SMITH, E.J.; SHI, L.; DRUMMOND, P.; PIERCE, K.; FOSTER, J. Expressed sequence tags for the chicken genome form a normalized 10-day-old white leghorn whole-embryo cDNA library. 1. DNA sequence characterization and linkage analysis. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92, n. 1, p. 1-8, Jan. 2001a.

SMITH, E.J.; SHI, L.; PREVOST, L.; RODRIGUEZ, L.; HAMILTON, R.; RAMLAL, S.; SMITH, G.; PIERCE, K.; FOSTER, J. Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized 10-day-old white leghorn whole-embryo cDNA library. 2. Comparative DNA sequence analysis of guinea fowl, quail, and turkey genomes. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, n. 9, p. 1263-1272, Sep. 2001b.

SMITH, E.J.; SHI, L.; SMITH, G. Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized 10-day-old white leghorn whole-embryo cDNA library. 3. DNA sequence analysis of genetic variation in commercial chicken populations. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 2, p. 261-267, Apr. 2002.

SMITH, J.; SPEED, D.; LAW, A.S.; GLASS, E.J.; BURT, D.W. In-silico identification of chicken immune-related genes. **Immunogenetics**, Berlin, v. 56, n. 2, p. 122-133, May 2004.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-31, Jan. 2000.

STURKIE, P.D. **Avian Physiology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2000. 685 p.

TANAKA, M.; HAYASHIDA, Y.; SAKAGUCHI, K.; OKUBO, T.; WAKITA, W.; HOSHINO, S.; NAKASHIMA, K. Growth hormone-independent expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in extrahepatic tissues of the chicken. **Endocrinology**, Springfield, v. 137, p. 30-34, Jan. 1996.

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

TIRUNAGARU, V.G.; SOFER, L.; CUI, J.; BURNISIDE, J. An expressed sequence tag database of T-cell-enriched activated chicken splenocytes: Sequence analysis of 5251 clones. **Genomics**, Orlando, v. 66, n. 2, p. 144-151, Jun. 2000.

TIGR. Disponível em: <<http://www.tigr.org>>. Acesso em: 2006.

ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell**, Cambridge, v. 61, p. 203-212, Apr. 1990.

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

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOLGENSTEIN, B.; TRAVERSO, G.; CROIX, B.S.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. Serial analysis of gene-expression. **Science**, Washington, v. 270, p. 484-487, Oct. 1995.

WATAKABE, A.; SUGAI, T.; NAKAYA, N.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; YAMAMORI, T.; NAWA, H. Similarity and variation in gene expression among human cerebral cortical subregions revealed by DNA macroarrays: technical considerations of RNA expression profiling from postmortem samples. **Molecular brain research**, Amsterdam, v. 88, p. 74-82, Mar. 2001.

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

YAMADA, D.; KOYAMA, Y.; KOMATSUBARA, M.; URABE, M.; MORI, M.; HASHIMOTO, Y.; NII, R.; KOBAYASHI, M.; NAKAMOTO, A.; OGIHARA, J.; KATO, J.; MIZUNO, S. Comprehensive search for chicken W chromosome-linked genes expressed in early female embryos from the female-minus-male subtracted cDNA macroarray. **Chromosome Research**, London, v. 12, n. 7, p. 741-754, Nov. 2004.

YIP R.G.; GOODMAN, H.M. Growth hormone and dexamethasone stimulate lipolysis and activate adenylyl cyclase in rat adipocytes by selectively shifting $G_i\alpha_2$ to lower density membrane fractions. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, p. 1219-1227, Mar. 1999.

YOUNGREN, O.M.; EL HALAWANI, M.E.; SILSBY, J.L.; PHILLIPS, R.E. Intracranial prolactin perfusion induces incubation behavior in turkey hens. **Biology of Reproduction**, Washington, v. 44, p. 425-443, Mar. 1991.