

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

**Expressão de genes envolvidos no controle molecular do desenvolvimento da  
musculatura esquelética em galinhas**

**Kerli Ninov**

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

**Piracicaba  
2010**

Kerli Ninov  
Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas

**Expressão de genes envolvidos no controle molecular do desenvolvimento da musculatura  
esquelética em galinhas**

Orientador:  
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

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

**Piracicaba  
2010**

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

Ninov, Kerli

Expressão de genes envolvidos no controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética em galinhas / Kerli Ninov. - - Piracicaba, 2010.  
84 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Diferenciação celular 2. Expressão gênica 3. Galinhas 4. Linhagens animais  
5. Melhoramento genético animal 6. Proliferação celular 7. Reação em cadeia por polimerase  
Título

CDD

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

**DEDICO**

Primeiramente à minha mãe **Dirlei**, exemplo de força e coragem, responsável por todas as minhas conquistas e vitórias.

À minha mãe e ao meu irmão **Márcio**, por todo incentivo e apoio, amor e dedicação. Simplesmente as pessoas mais importantes da minha vida.

**OFERECO**

Ao meu pai Oscar (*in memoriam*)



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Luiz Lehmann Coutinho**, pela orientação e ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr **Gerson Barreto Mourão**, pela atenção na análise estatística.

À Dra. **Mônica Corrêa Ledur**, pela orientação, apoio e amizade.

Ao **CNPq** e **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal, **Nirlei** e **Jorge** pelo apoio e amizade durante estes anos.

Aos **amigos e colegas** do Laboratório de Biotecnologia Animal: **Andrezza, Áurea, Erika, Gustavo, Lilian, Minos, Fernanda Saválio, Fernanda Elisa** e **Thaís** pela agradável convivência e troca de experiências durante estes anos.

À **Ana Paula Dini, Clarissa Boschiero, Helena J. Alves** e ao **Millor F. do Rosário** pelo incentivo e amizade de longos anos.

As meninas-mulheres-amigas da república, **Bel, Esmerê, Flipper, Kinha, Nai** e **Pri**, uma mistura de cultura, região e religião que rendeu momentos que ficarão guardados para sempre.

Especial ao **Luiz Rodrigo Lot**, pela companhia, carinho e paciência durante estes anos.

**A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.**



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Biotecnologia e Genômica Avícola.....	17
2.2 Musculatura Esquelética.....	19
2.3 Controle Molecular do Desenvolvimento Muscular .....	23
2.3.1 Fatores Regulatórios Miogênicos .....	23
2.3.2 Pax7 .....	25
2.3.3 Miostatina .....	25
2.4 Via de Sinalização <i>Sonic Hedgehog</i> (Shh).....	26
2.5 RT-PCR Quantitativa em Tempo Real.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Linhagens de Aves.....	33
3.2 Incubação dos Ovos e Coleta de Tecidos .....	33
3.3 Extração do RNA Total .....	33
3.4 Síntese de cDNA .....	34
3.5 Desenho dos <i>Primers</i> .....	34
3.6 RT-PCR Quantitativa em Tempo Real.....	36
3.7 Análise da Expressão Gênica .....	37
3.7.1 Eficiência de Amplificação .....	37
3.7.2 Normalização dos Dados .....	38
3.7.3 Análise Estatística .....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1 Extração de RNA total.....	41
4.2 Especificidade dos <i>Primers</i> e Eficiência de Amplificação.....	41
4.3 Normalização e Análise dos dados.....	46
4.3.1 GeNorm .....	47
4.3.2 Correlação.....	47



4.4 Expressão Relativa dos Fatores Miogênicos, Miostatina e Pax7.....	49
4.4.1 Ontogenia da expressão dos Fatores Miogênicos, Miostatina e Pax7 .....	50
4.4.2 Expressão dos Fatores Miogênicos, Pax7 e Miostatina entre as Linhagens .....	57
4.5 Expressão Relativa da Via de Ação Shh .....	59
4.5.1 Ontogenia da expressão da Via de Ação Shh .....	60
4.5.2 Expressão da Via de Ação Shh entre as linhagens.....	67
5 CONCLUSÃO .....	69
REFERÊNCIAS.....	71

## RESUMO

### **Expressão de genes envolvidos no controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética em galinhas**

O desenvolvimento do músculo esquelético em vertebrados é um processo bem organizado que envolve diversos eventos, inicia-se na fase embrionária e continua durante toda a vida. Esse processo biológico requer uma adequada sinalização celular e é regulado por inúmeros genes. Em busca do entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na determinação do desenvolvimento e crescimento do tecido muscular foi acompanhada a expressão gênica dos fatores miogênicos (MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4); Pax7; Miostatina; e da via de ação Shh (Shh, Ptch1, Smo, Pka, Sufu, Gli2 e Gli3) na musculatura peitoral de duas linhagens de galinhas de composições genéticas distintas. Uma linhagem de corte, selecionada para maior deposição de massa muscular, e outra de postura, caracterizada pela baixa taxa de crescimento e pouca massa muscular. Foram utilizados 90 animais distribuídos nas duas linhagens e cinco estádios de desenvolvimento: 9 e 17 dias da fase embrionária e 1, 21 e 42 dias da fase pós-eclosão. A expressão gênica foi analisada por PCR quantitativa em tempo real. Os genes Myf5, Miogenina, MRF4, Pax7, Shh e Ptch1 foram diferencialmente expressos na ontogenia e entre as linhagens. Já os genes MyoD, Miostatina, Smo, Pka, Sufu, Gli2 e Gli3 foram diferencialmente expressos somente na ontogenia. Foi possível traçar o perfil de expressão dos genes ao longo das fases de desenvolvimento. Os genes MyoD, Myf5 e Pax7 foram mais expressos na fase embrionária, onde há maior proliferação celular. Durante as fases estudadas, os genes da Miogenina e MRF4 apresentaram uma auto-regulação entre eles, indicando a ocorrência do processo de diferenciação celular. O gene da Miostatina demonstrou estar inibindo o crescimento muscular nos dias que antecedem a eclosão. Os genes da via de ação Shh foram mais expressos nas idades embrionárias, onde esta via age como um fator de sobrevivência e proliferação celular e menos expressos nas idades posteriores a eclosão, provavelmente, para que haja o processo de diferenciação dos mioblastos. Verificou-se que esses genes foram diferencialmente expressos sendo coordenados espaço-temporalmente, permitindo assim um ajuste sutil entre proliferação e diferenciação das células musculares, colaborando para as diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens.

Palavras chave: PCR quantitativa em tempo real; Expressão gênica; Desenvolvimento muscular; Fatores regulatórios miogênicos; Via de ação Shh; Proliferação celular; Diferenciação celular



## ABSTRACT

### **Expression of genes involved in molecular control of skeletal muscle development in chicken**

The development of skeletal muscle in vertebrates is a well-organized process that involves several events, initiating in the embryonic phase and continuing throughout life. This biological process requires a proper cell signaling and is regulated by numerous genes. Aiming to understand the molecular mechanisms involved in determining the development and growth of muscle tissue, we monitored gene expression of myogenic factors (MyoD, Myf5, Myogenin and MRF4); Pax7; Myostatin; and Shh pathway (Shh, Ptch1, Smo, Pka, Sufu, Gli2 and Gli3) in the pectoralis muscle of two strains of poultry from different genetic compositions. A broiler, selected for increased deposition of muscle mass, and a layer, characterized by slow growth and low muscle mass. We used 90 animals divided into two lines and five stages of development: 9 and 17 days of embryo and 1, 21 and 42 days post-hatching. Gene expression was analyzed by quantitative real-time PCR. The genes Myf5, Myogenin, MRF4, Pax7, Shh and Ptch1 are differentially expressed in ontogeny and among strains. The genes MyoD, myostatin, Smo, Pka, Sufu, Gli2 and Gli3 were differentially expressed only in ontogeny. It was possible to design the gene expression profile throughout the different developmental stages. The genes MyoD, Myf5 and Pax7 were more expressed in the embryo, where there is greater cell proliferation. During the four phases, the genes MRF4 and Myogenin showed self-regulation among them, indicating the occurrence of the cell differentiation process. The myostatin gene proved to be inhibiting muscle growth in the days before hatching. The genes of the Shh action were more highly expressed in embryonic ages, where this pathway acts as a survival factor and cellular proliferation, and less expressed in later times after hatching, probably to allow for the differentiation of myoblasts. We found that these genes were differentially expressed being coordinated in space and time, allowing, thus, a subtle tuning between proliferation and differentiation of muscle cells, contributing to the phenotypic differences observed between strains.

**Keywords:** Quantitative real-time PCR; Gene expression; Muscle development; Myogenic regulatory factors; Shh pathway; Cell Proliferation; Cell differentiation



## 1 INTRODUÇÃO

Desde que a moderna indústria avícola começou, a mais de 50 anos atrás, a produção global de carne de aves tem apresentado uma contínua expansão e alterações significativas têm ocorrido no mercado consumidor (BERRI et al., 2007). O aumento do consumo de carne de frango fez com que o setor avícola se tornasse um segmento dinâmico. As empresas avícolas estão envolvidas no desenvolvimento de tecnologia de alimentos e desenvolvimento de produtos, e a melhoria da capacidade de transformação de carne no período *post mortem* tornou-se uma preocupação mais prevalente. A mudança no mercado de processamento de aves tem sido relacionada com a melhoria no crescimento e rendimento de carcaça de aves, com um aumento significativo na proporção do músculo peitoral (BERRI et al., 2007).

Os altos índices de produtividade alcançados pela indústria avícola resultantes principalmente de ganhos genéticos obtidos por meio da seleção baseada no fenótipo. Durante os últimos 80 anos, a seleção de linhagens de aves proporcionou inúmeros benefícios e dentre eles o aumento da produção de carne e ovos foi o que mais se destacou (BURT, 2002). Segundo Doherty et al. (2004), a seleção de aves para a produção de carne (corte) levou a geração de linhagens com um maior crescimento do músculo do peito. Em contrapartida, aves selecionadas para produção de ovos (postura) apresentam um crescimento mais lento e uma menor deposição de musculatura peitoral.

A genética molecular aplicada ao melhoramento animal tem como objetivo principal tornar as estratégias convencionais de seleção mais eficientes, promovendo maiores progressos genéticos em curto prazo. Algumas das diferenças genéticas entre os indivíduos são devidas a mutações em um único gene. No entanto, a maioria das características de importância econômica, como aquelas relacionadas a crescimento, fertilidade e resistência a doenças, é influenciada por diversos genes, cada um contribuindo com um pequeno efeito (BURT; HOCKING, 2002).

O desenvolvimento do músculo esquelético em vertebrados é um processo bem organizado que envolve diversos eventos, inicia na fase embrionária e continua durante toda a vida. Esses processos biológicos envolvem a adesão celular, migração celular e a interação célula-célula. O número de fibras musculares é determinado durante a embriogênese e nesta fase, estruturas denominadas somitos sofrem compartimentalizações e darão origem aos mioblastos,

que são células precursoras da musculatura. Essas células irão proliferar e migrar para locais específicos, onde se diferenciarão em miotubos e finalmente se agruparão para formar as fibras musculares (BUCKINGHAM, et al., 2003). Desse modo o crescimento muscular durante a fase embrionária é determinado pelo processo de hiperplasia, ou seja, pela proliferação dos mioblastos. O crescimento muscular após o nascimento, por sua vez, ocorre principalmente pelo aumento do tamanho de fibras musculares (hipertrofia), que é a consequência do aumento do volume celular.

Os processos determinantes da miogênese são regulados por inúmeros genes, dentre os quais se destaca a família dos fatores regulatórios da miogênese (FRM): MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 (NAYA;OLSON, 1999). MyoD e Myf5 são expressos nos mioblastos em proliferação, enquanto que a Miogenina e MRF4 são expressos somente em células musculares. O fator de transcrição *Paired box 7* (Pax7) é expresso em células satélites quiescentes e tem sido demonstrado que é expresso simultaneamente com MyoD durante a proliferação celular e sua expressão é reduzida quando as células sofrem diferenciação (SEALE, P. e t al. 2000; HALEVY, et al. 2004). Outro gene importante na regulação do crescimento muscular tanto na fase embrionária quanto após o nascimento é o *Sonic hedgehog* (Shh). Foi demonstrado que Shh estimula a proliferação e diferenciação dos mioblastos durante o desenvolvimento dos membros de embriões de aves (DUPREZ et al., 1998). No período após o nascimento, foi relatado o envolvimento de Shh na sobrevivência e proliferação celular, porém o seu papel na diferenciação celular não está claro (LI, et al., 2004; KOLEVA, 2005).

Em busca do entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na determinação do desenvolvimento e crescimento do tecido muscular, o objetivo do presente estudo foi realizar uma investigação de genes envolvidos no controle do desenvolvimento da musculatura esquelética de galinhas. Foi acompanhada a expressão dos fatores miogênicos (MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4); Pax7; Miostatina; e dos genes da via de ação Shh (Shh, Ptch1, Smo, Pka, Sufu, Gli2 e Gli3) na musculatura peitoral de aves de duas linhagens de composição genética distinta: uma de corte (TT) e outra de postura (CC) em diferentes estádios de desenvolvimento da fase embrionária e pós-eclosão.

A hipótese do presente estudo é que durante a miogênese a expressão dos genes mencionados anteriormente seja coordenada espaço-temporalmente fazendo com que estas moléculas atuem no ajuste sutil entre proliferação e diferenciação das células musculares, e que

esses genes sejam diferencialmente expressos entre as linhagens de postura e de corte, colaborando para as diferenças fenotípicas observadas entre as mesmas.





## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biotecnologia e Genômica Avícola

Por ser grande produtor de grãos e pelos avanços tecnológicos alcançados, tanto na área genética como na industrial, o Brasil ganha importância cada vez maior, seja na produção, no consumo ou nas exportações de frangos. A indústria e os produtores brasileiros têm recebido relevantes contribuições dos programas de melhoramento genético. Entretanto, para que as indústrias brasileiras mantenham o nível de competitividade no mercado, será imprescindível a incorporação de novas técnicas moleculares como ferramentas nos programas tradicionais de melhoramento genético para que maiores progressos sejam obtidos.

O seqüenciamento do genoma da galinha trouxe novas perspectivas para a moderna produção animal. O primeiro genoma seqüenciado em aves foi obtido a partir de uma fêmea da raça *Red Jungle Fowl* (*Gallus gallus*), espécie da qual descendem todas as raças e linhagens de galinhas domésticas, em um trabalho realizado pelo Consórcio Internacional de Seqüenciamento do Genoma da Galinha (HILLIER et al., 2004). De acordo com esses autores, o genoma da galinha servirá de modelo para outras 9.600 espécies de aves, além de conduzir a novas evidências para a compreensão do genoma humano e contribuir para a criação de galinhas mais saudáveis.

A galinha possui um genoma relativamente pequeno compreendendo  $1,2 \times 10^9$  pares de base (pb), o que equivale a um terço do genoma humano, contendo um baixo número de DNA repetitivo, somente 11% quando comparado aos 40% a 50% encontrado em mamíferos, o que facilita o seqüenciamento e a procura por genes (HILLIER et al., 2004). O genoma da galinha é composto por 38 pares de autossomos (cinco são macrocromossomos, cinco são intermediários e 28 são microcromossomos) e um par de cromossomos sexuais (Z e W). Diferente dos mamíferos, nas aves a fêmea é o sexo heterogamético (ZW) e o macho o sexo homogamético (ZZ). Os microcromossomos da galinha têm uma taxa de recombinação de 6,4 cM/Mb enquanto que os macrocromossomos de 2,8 cM/Mb, contrastando com 1–2 cM/Mb para a maioria dos cromossomos humanos. Essa alta taxa de recombinação faz da galinha um organismo ideal para estudos de ligação gênica, porém, mapas genéticos de alta resolução serão necessários para definir a taxa de recombinação dentro dos cromossomos (SCHMID et al., 2005).

As aves têm sido bastante utilizadas como modelo para estudo da biologia do desenvolvimento de vertebrados, pois seus embriões são de fácil acesso, rapidamente obtidos e

podem ser manipulados *in vivo (in ovo)* mais facilmente do que embriões de mamíferos (BROWN et al., 2003; STERN, 2005). Uma galinha põe muitos ovos por ano, assim produzindo uma prole maior do que mamíferos. Em adição, o desenvolvimento embrionário de aves, da fertilização até a eclosão demora 21 dias, um espaço de desenvolvimento muito menor que a maioria dos mamíferos, permitindo um rápido acúmulo e interpretação de dados (LIU; HICKS 2007). As aves constituem um dos sistemas experimentais mais versáteis, e tem contribuído amplamente com a biologia celular, molecular e genética (STERN, 2005).

Aves de corte e de postura são modelos ideais para estudar mecanismos de controle da miogênese, pois, durante os últimos anos, a seleção genética levou a um grande crescimento da massa muscular das aves de corte. Em contraste, aves de postura foram selecionadas para produção de ovos e redução de peso. Essa divergência fenotípica entre frangos de corte e postura nos permite utilizar estes animais para investigar muitas questões interessantes relacionadas ao controle do crescimento muscular (VELLEMAN, 2007). A indústria avícola, por muito tempo, selecionou animais baseando-se no fenótipo, considerando características como taxa de crescimento e peso da musculatura. E essa estratégia favoreceu uma seleção baseada mais na hipertrofia do que na hiperplasia muscular (VELLEMAN, 2007). Diversos fatores moleculares estão envolvidos na regulação do desenvolvimento muscular, entender esses mecanismos é importante para melhorar e manter a qualidade da carne de aves.

No Brasil, a Embrapa Suínos e Aves e o Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP) desenvolvem inúmeros estudos na área de genômica de aves, com o objetivo de mapear locos de características quantitativas (QTLs) e identificar genes candidatos para várias características de importância econômica. Para esse estudo foi desenvolvida uma população F<sub>2</sub> específica para estudos de mapeamento de QTLs, que vêm sendo utilizada para identificar marcadores associados a características de crescimento, consumo, eficiência alimentar, composição e rendimento de carcaça (LEDUR; BERTANI, 2002).

Diversos estudos foram desenvolvidos com estas linhagens a fim de identificar e caracterizar genes envolvidos no desenvolvimento muscular. Souza et al. (2005) associaram um polimorfismo no gene da Miogenina com as características de peso vivo aos 42 dias de idade, ganho de peso do nascimento aos 42 dias de idade, ganho de peso dos 35 aos 42 dias de idade, peso da carcaça, peso das asas e da carcaça residual, peso da gordura abdominal, peso do fígado e dos pulmões. Embora o polimorfismo esteja localizado em uma região codificadora, não

implicou em qualquer alteração na seqüência de aminoácidos. Este resultado sugere que, possivelmente, este polimorfismo deve estar atuando como um marcador genético próximo ao verdadeiro sítio polimórfico responsável pelas variações fenotípicas observadas.

A expressão dos fatores miogênicos, Miogenina, MyoD e MRF4 foi quantificada nessas linhagens em estádios iniciais do desenvolvimento embrionário (ALVARES, 2001) e nos músculos *Biceps femoris* e *Gastrocnemius lateralis* nos estádios 21 e 42 após a eclosão (MARCHESIN, 2008). Etiquetas de seqüências expressas (ESTs) foram identificadas nos tecidos precursores de músculo (somitos), nos membros em desenvolvimento (JORGE et al., 2004) e na musculatura peitoral (ALVES, 2004). Jorge (2006) utilizou microarranjos para a quantificação em larga escala da expressão gênica diferencial. Andreote (2009) caracterizou microRNAs (miR), analisou a expressão do miR-133a e miR-206 juntamente com genes SRF, Tstl e Pola1 regulados pelos miR-133a e miR-206. Boschiero et al. (2009) estudou o gene IGF1 na busca por polimorfismos em seis regiões de exons e introns. Este gene candidato está localizado no intervalo entre dois marcadores microssatélites (*LEI0146* e *LEI0174*) onde foram mapeados QTLs para pesos vivos aos 35 e 41 dias, peso do coração e pulmões no cromossomo 1 da galinha (BOSCHIERO et al., 2008). As informações provenientes do estudo desta população de galinhas contribuirão com os programas de melhoramento genético, visando melhorar a produção e qualidade do produto final.

## **2.2 Musculatura Esquelética**

A capacidade de crescimento de um animal depende em grande parte do número de fibras musculares formadas durante o desenvolvimento embrionário (TE PAS et al., 2004). A maioria dos músculos esqueléticos de aves e mamíferos, com exceção de alguns músculos craniofaciais e esofágicos, é formada à partir dos somitos, que são condensações transitórias do mesoderme paraxial originadas em ambos os lados do tubo neural do embrião (POWNALL et al., 2002). Os somitos compartimentalizam-se ao longo do eixo dorso-ventral do embrião e originam o dermomiótomo, localizado dorsalmente, e o esclerótomo, localizado ventralmente dando origem a cartilagem e os ossos. O dermomiótomo amadurece em miótomo (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002), onde as células pluripotentes são determinadas a expressarem genes músculo específicos, tornando-se mioblastos, as células precursoras musculares. Há duas linhagens miogênicas distintas no miótomo. A parte medial do miótomo da origem a linhagem que provem

células da musculatura epaxial, dorso, enquanto o miótomo lateral produz a musculatura hipaxial, músculos torácicos e abdominais (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002) (Figura 1).

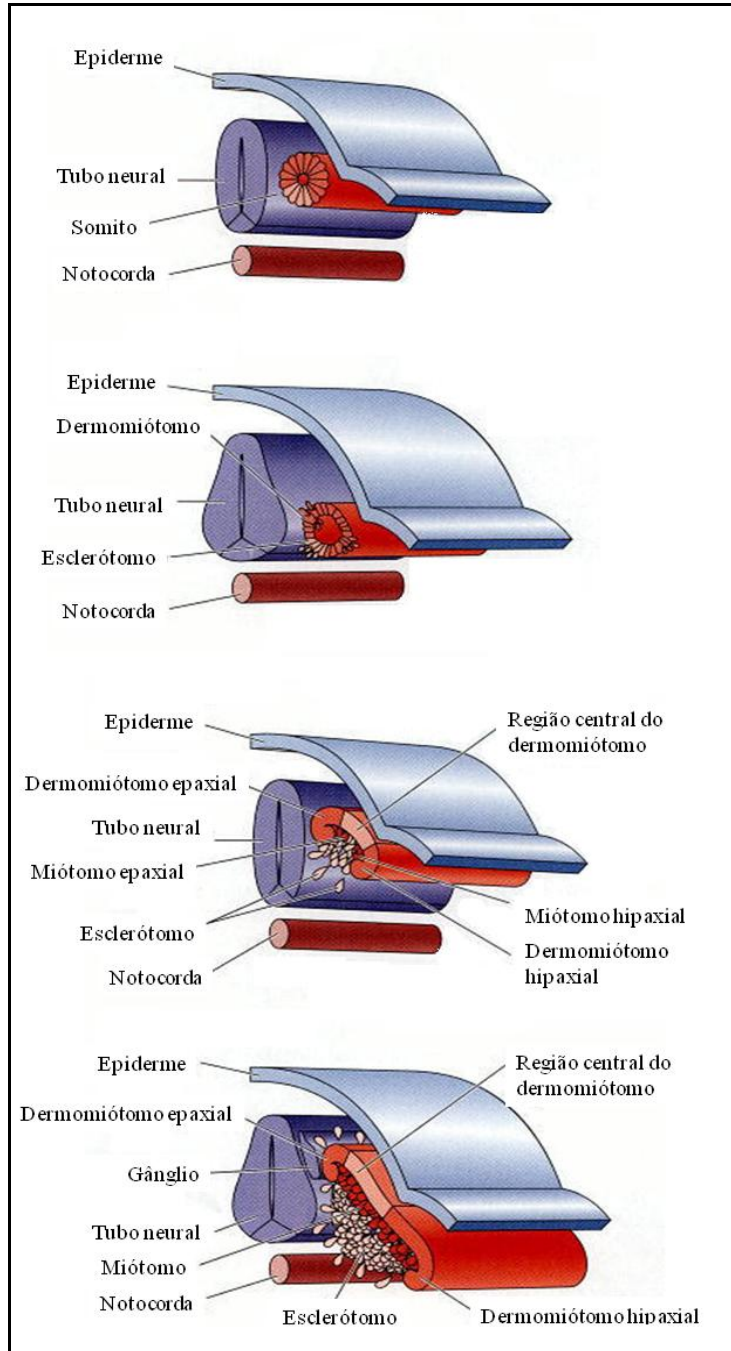


Figura 1– Representação esquemática da somitogênese (adaptado de Gilbert, 2006)

A musculatura esquelética é formada em etapas distintas, embora sobrepostas, que envolve diferentes populações de mioblastos. Estudos envolvendo aves e mamíferos demonstraram que os mioblastos, podem ser classificados em populações distintas de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas (STOCKDALE, 1992). Estes podem ser classificados em mioblastos embrionários, fetais e adultos. Em galinhas, os mioblastos embrionários são abundantes aos 5 dias da idade embrionária, os mioblastos fetais são presentes entre os dias 8 e 12 da idade embrionária, e os mioblastos adultos, também conhecidos como células satélites, aparecem nos estádios finais do desenvolvimento embrionário e mantêm-se até a idade adulta (STOCKDALE; 1992).

A regulação do processo de formação dos músculos esqueléticos envolve a apropriada ativação, proliferação e diferenciação dos mioblastos e depende da expressão e atividade de fatores transcricionais, conhecidos como fatores de regulação miogênica (PARKER et al., 2003). Durante o desenvolvimento embrionário, o comprometimento das células somáticas da mesoderme com a linhagem miogênica depende inicialmente de sinais oriundos de tecidos circundantes, como a ectoderme, notocorda e tubo neural. Esses sinais irão ativar os genes capazes de transformar células não musculares em células com um fenótipo muscular. A determinação do fenótipo muscular está associada à expressão de genes da família dos fatores regulatórios da miogênese (MRFs): MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4. Os fatores miogênicos agem juntamente com outras moléculas sinalizadoras, como as proteínas da família Shh e Pax em diferentes fases da miogênese embrionária e adulta (BRYSON-RICHARDSON; CURRIE, 2008).

De acordo com Smith (1963) o desenvolvimento do músculo esquelético em vertebrados é um processo bem organizado que envolve diversos eventos, começa no início da fase embrionária e continua durante toda a vida. O crescimento muscular ocorre de duas formas: hiperplasia e hipertrofia. A hiperplasia é definida como o aumento do número de células, enquanto que a hipertrofia refere-se ao aumento do tamanho da fibra muscular. O número de miofibras embrionárias é definido próximo ao nascimento ou a eclosão. O crescimento muscular após o nascimento ocorre pelo aumento do tamanho de fibras musculares, que é a consequência do acúmulo e proteínas musculares, o que gera um aumento no volume celular, e fusão de células satélites com as fibras existentes (MOSS, 1968). Tanto a hiperplasia como a hipertrofia, são reguladas por interações entre células musculares e sua matriz extracelular (VELLEMAN, 2007).

Células satélites são as células precursoras da musculatura esquelética após o nascimento. Estas células estão localizadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal da fibra muscular (SEALE; RUDNICK 2000). Após o nascimento, as células satélites são as únicas células musculares que ainda proliferam, diferenciam-se e fundem-se com as fibras musculares adjacentes ou com outras células satélites (MAURO, 1961). Os núcleos adicionais são então acrescentados às fibras musculares, levando a um acréscimo da massa muscular através do aumento da síntese protéica, resultando na hipertrofia da fibra muscular (ALLEN et al., 1979). No músculo maduro, células satélites são quiescentes, mas podem ser ativadas em resposta a estímulos como crescimento e injúrias, para reparar as miofibras. Este processo consiste em curta fase de proliferação, seguida pela saída do ciclo celular, a diferenciação em mioblastos e finalmente a fusão com os miotubos (KOLEVA et al., 2005). Células satélites quiescentes expressam a proteína Pax7 (ZAMMIT; BEAUCHAMP, 2001), durante a proliferação expressam MyoD, Myf5 e Pax7 (ZAMMIT et al., 2006; KOLEVA et al., 2005), enquanto que MRF4 e Miogenina são necessário para a formação dos miotubos (Figura 2)

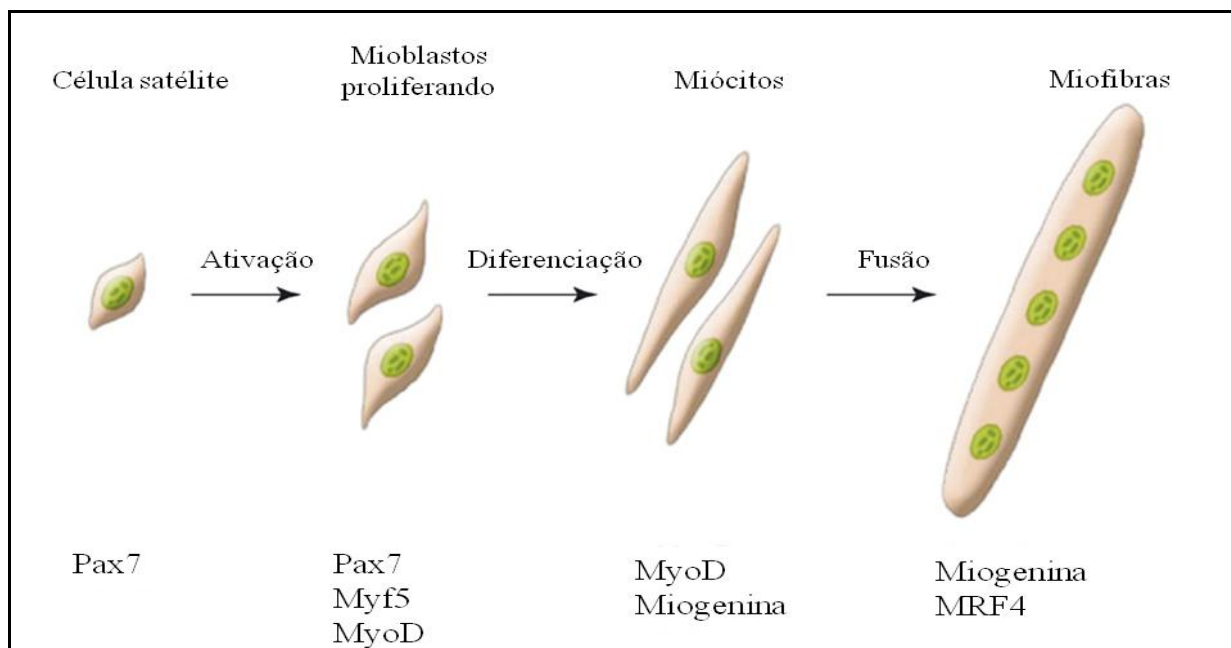


Figura 2 - Processo de formação da musculatura esquelética envolvendo a ativação, proliferação e diferenciação dos mioblastos (Adaptado de Le Grand; Rudnicki, 2007)

## 2.3 Controle Molecular do Desenvolvimento Muscular

A determinação e a diferenciação das células da musculatura esquelética dos organismos vertebrados dependem de um complexo sistema de regulação gênica. Este sistema é composto por uma rede de fatores de transcrição que atuam desde o desenvolvimento embrionário para garantir a adequada formação dos músculos esqueléticos.

Dentre estes fatores, os genes pertencentes à família dos fatores regulatórios miogênicos (FRMs), MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4, são os mais conhecidos devido ao papel fundamental que desempenham neste processo. Os FRMs, pertencem à família bHLH (*basic helix-loop-helix*) e regulam a ativação, proliferação e diferenciação de células miogênicas (LUDOLPH; KONIECZNY, 1995). Experimentos de nocaute gênico elucidaram a função dos quatro fatores desta família no processo de desenvolvimento muscular. Estes estudos mostraram que MyoD e Myf5 desempenham papéis redundantes na geração de células precursoras musculares, enquanto a Miogenina atua em uma etapa posterior, dirigindo a diferenciação dos mioblastos. O fator MFR4 é expresso tardiamente durante a embriogênese, bem como em animais adultos, e parece compartilhar muitas de suas funções com a Miogenina (LUDOLPH; KONIECZNY 1995).

Embora a família do fator MyoD desempenhe um papel chave no controle do desenvolvimento muscular, outros fatores também atuam nesse processo. Dentre estes fatores estão os genes da família Pax, envolvidos na proliferação de várias linhagens de precursores miogênicos (POWNALL et al., 2002; CHARGE; RUDNICKI, 2004). Outro gene importante que atua durante o desenvolvimento da musculatura esquelética é a Miostatina. Este gene, membro da família de fatores de crescimento TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* ), é um potente fator de crescimento e de diferenciação envolvido na formação do tecido muscular esquelético dos vertebrados (CASTELHANO-BARBOSA et al., 2005).

### 2.3.1 Fatores Regulatórios Miogênicos

Dentre os quatro membros da família dos FRMs, o MyoD (*myogenic differentiation*) e Myf5 (*myogenic factor 5*) denominados primários, são necessários para a etapa de determinação, comprometendo as células proliferativas dos somitos com a linhagem miogênica (CHEN;GOLDHAMER, 1999; BERKES; TAPSCOTT, 2005). Em aves, o primeiro gene a ser ativado é MyoD, seguido por Myf5 (COUTINHO et al.,1993).



A proteína de MyoD é expressa em células indiferenciadas e diferenciadas (PURI; SARTORELLI 2000). Durante o estágio embrionário, MyoD dirige a proliferação das células precursoras miogênicas em direção a linhagem muscular esquelética (BERKES; TAPSCOTT, 2005). Quando os animais nascem, MyoD controla a entrada das células satélites no ciclo celular, a proliferação e a fusão em miofibras, promovendo assim a hipertrofia muscular (COOPER et al., 1999). Coutinho et al. (1993) demonstraram a importância dos eventos pré-natais para o estabelecimento de um maior desenvolvimento muscular. Comparando codornas selecionadas para crescimento, que apresentam três vezes mais massa muscular, com codornas de linhagem controle, os autores detectaram níveis diferenciados de expressão de MyoD entre as linhagens. Na linhagem selecionada diagnosticou-se um atraso na expressão de MyoD, com um retardo na formação dos somitos durante as primeiras 60 horas do desenvolvimento embrionário. Esse atraso na formação dos somitos e na expressão de MyoD pode ter possibilitado um maior tempo de proliferação das células precursoras musculares, resultando no aumento do número de fibras musculares na linhagem selecionada, na fase adulta.

A regulação negativa do fator Myf5 antecede a diferenciação muscular (LINDON et al., 1998). Quando ocorre a queda na expressão de Myf5 na célula pode ser, possivelmente, em função do início do processo de diferenciação. Por outro lado, em células que mantêm altos níveis de Myf5, este, pode agir impedindo a continuação dos mioblastos no ciclo celular, assim direcionando-os para reserva, quiescência e auto-renovação (DAY et al., 2009; SEALE; RUDNICKI, 2000). Myf5 é expresso na maioria das células satélites quiescentes (BEAUCHAMP, et al., 2000), e também em células satélites ativadas, ou seja, entrando no ciclo celular, resultando na determinação de células musculares (DAY et al., 2009; SEALE; RUDNICKI 2000).

O FRMs secundários, MRF4 também conhecido com Myf6 (*Myogenic factor 6*) e Miogenina, atuam na diferenciação dos miócitos e maturação das miofibras (PURI; SARTORELLI, 2000). MRF4 funciona como um regulador positivo da transcrição e está envolvido na maturação dos miotubos durante a diferenciação terminal (FERRI et al., 2009). A Miogenina possui papel exclusivo e direto na diferenciação muscular e ativação de genes músculo-específicos. O controle da expressão de Miogenina é regulado pela expressão do MRF4. Assim, pode-se inferir que MRF4 atua sinergicamente com a Miogenina tanto na diferenciação celular quanto na maturação dos mioblastos (HASTY et al., 1993; BRAUN & ARNOLD, 1995).

Segundo Zhang et al. (1995) a localização de Miogenina e MRF4 nos miotubos parece mudar reciprocamente, sugerindo que Miogenina e MRF4 regulam um subconjunto distinto de genes alvos envolvidos na formação e maturação dos miotubos. Diversos resultados confirmam a inibição de Miogenina por MRF4 (FERRI et al., 2009; ZHANG et al., 1995), pois quando há aumento da expressão de MRF4 ocorre um declínio de Miogenina.

### 2.3.2 Pax7

Diversos estudos relatam o envolvimento dos genes Pax3 e Pax7, dois dos nove genes da família de genes *Paired Box*, na miogênese e no crescimento muscular pós-natal. *Pax7* é um fator de transcrição expresso em células satélites em proliferação. Uma mutação no gene *Pax7* leva a ausência de células satélites, mostrando que esse gene é extremamente importante para a especificação da população de células satélites (SEALE et al., 2000).

Segundo Olguin et al. (2007), existe uma interação inibitória cruzada entre Pax7 e os membros da família dos FRMs. Essa interação pode representar um mecanismo adicional para o controle do destino das células satélites, resultando em proliferação, diferenciação e auto-renovação, processos necessários para a manutenção e reparação do músculo esquelético (OLGUIN et al., 2007). Embora, normalmente, Pax7 seja regulado negativamente durante a diferenciação miogênica, sua expressão permanente não impede a fusão dos mioblastos em miotubos multinucleados. No entanto, a regulação negativa de Pax7 é necessária para que aconteça a diferenciação terminal (ZAMMIT et al., 2006). Na musculatura esquelética, o declínio na expressão de Pax7, juntamente com o início da expressão de Miogenina, marca a entrada dos mioblastos na fase de diferenciação (YABLONKA-REUVENI et al., 2008; SHEFER et al., 2006). Essa etapa do compromisso com a diferenciação é rapidamente seguida pela saída do ciclo celular, subsequente expressão de proteínas estruturais musculares, e pela fusão em miotubos (HALEVY et al., 2004).

### 2.3.3 Miostatina

A proteína Miostatina, também conhecida como fator 8 de crescimento e diferenciação (do inglês *growth and differentiation factor 8/GDF8*), foi identificada por MCPHERRON et al. (1997) como um regulador negativo do crescimento muscular. Estes autores verificaram que, a inativação do gene da Miostatina em camundongos levou ao aumento de até

três vezes na massa de diversos músculos esqueléticos, tanto devido à hiperplasia quanto à hipertrofia. Em adição, foram observadas mutações no gene da Miostatina em bovinos de musculatura dupla, que apresentam cerca de 20% de aumento da massa muscular, ou seja, um aumento no número de fibras musculares em relação aos indivíduos com desenvolvimento muscular normal (GROBET et al., 1997).

Durante a miogênese, a Miostatina inibe a proliferação e diferenciação dos mioblastos (LANGLEY et al., 2002). No final do estágio embrionário a Miostatina é altamente expressa em diversos tecidos. Este alto nível de expressão indica uma redução na proliferação de mioblastos e uma regulação negativa do crescimento muscular (AMTHOR et al., 2002). Segundo estes mesmos autores, pode-se especular que o tamanho muscular (hipertrofia) deve ser restrito durante o desenvolvimento embrionário para evitar a superprodução de músculo, mantendo a possibilidade de criar mais massa muscular e com o intuito de adaptação às novas condições após a eclosão.

#### **2.4 Via de Sinalização *Sonic Hedgehog* (Shh)**

O gene Hedgehog (Hh) foi identificado pela primeira vez em *Drosophila*, e três ortólogos foram identificados posteriormente em vertebrados: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh), e Indian hedgehog (Ihh) (INGHAM; MCMAHON, 2001).

A família de genes Hedgehog codifica moléculas sinalizadoras que são essenciais para padronização de membros e crescimento tanto de invertebrados quanto de vertebrados (INGHAM; MCMAHON, 2001). Os membros da família Hh, são morfógenos, exercem seus efeitos sobre células vizinhas e distantes. Uma característica importante das proteínas Hh é a modificação lipídica, uma propriedade que tem um efeito essencial na propagação da atividade de sinalização celular (LI et al., 2006). A proteína Hh é sintetizada como uma molécula precursora composta por dois domínios, um N-terminal (N-Hh) e um domínio C-terminal (C-Hh). O domínio N-Hh passa por duas modificações lipídicas, uma é a adição de uma molécula de colesterol em seu domínio C-terminal e outra é a adição de um grupo palmitoil a sua porção N-terminal (LEWIS et al., 2001). Estas alterações são essenciais para o alcance da ação da sinalização e também necessárias para a sinalização adequada através do receptor Patched (Ptch1) (LI et al., 2006).

O Sonic hedgehog é o membro mais estudado da família Hh. A proteína Shh age através da sua ligação a um receptor de transmembrana chamado Patched (Ptch1) (Figura 3). Essa

ligação inibe Ptc1 e libera a proteína de transmembrana Smoothened (Smo) e inibe a clivagem proteolítica do fator de transcrição Gli, levando a família de proteínas Gli a entrar no núcleo da célula e agir como um ativador de transcrição dos genes que essa via reprime quando Ptc1 está livre (JIA; JIANG 2006, HOOPER; SCOTT, 2006).

Na ausência da sinalização Shh, a proteína Ptc1 encontra-se dimerizada com a proteína Smo, desta forma inibindo a atividade de Smo. Assim, PKA promove a clivagem da proteína Gli que se liga aos microtúbulos através da proteína Sufu, impedindo a transmissão do sinal proliferativo, que é transmitido pela ativação de Gli. Esta ligação permite que PKA clive Gli, gerando um repressor transcricional que bloqueará a transcrição de alguns genes alvo (JIA; JIANG 2006, HOOPER; SCOTT, 2006).

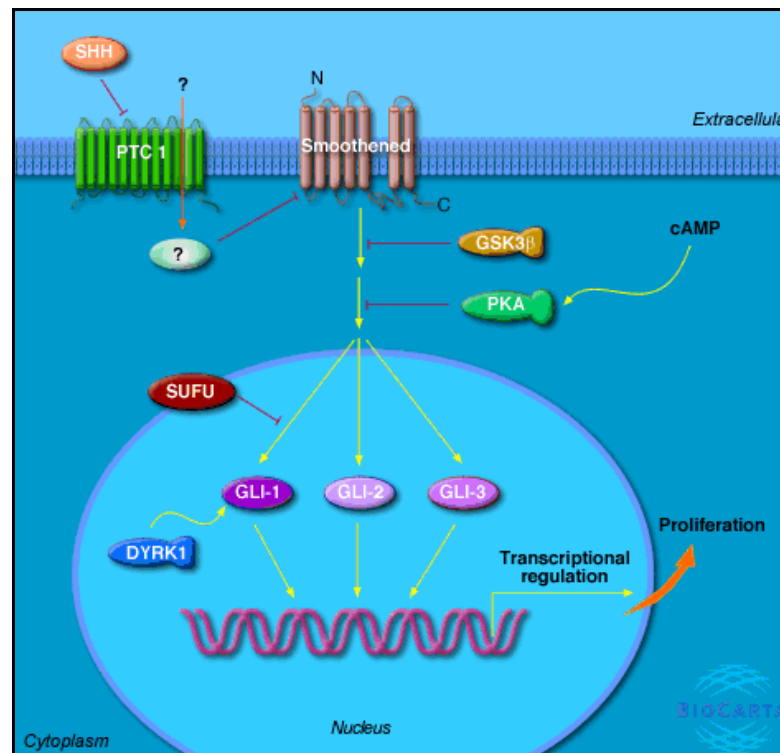


Figura 3 - Via de ação Sonic Hedgehog . Fonte Biocarta ([http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h\\_shhPathway](http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_shhPathway))

Shh é um dos primeiros sinais morfógenos que especifica os padrões de crescimento e diferenciação celular durante o desenvolvimento dos vertebrados. Durante a embriogênese a cascata Hh é usada repetidamente e em diferentes tecidos induzindo um grande número de processos de desenvolvimento. A expressão de Shh é inicialmente limitada a notocorda, mas logo é induzida em células do tubo neural. Este gene também é expresso na zona

de atividade polarizadora (ZPA) do broto do membro e atua no padrão de desenvolvimento dos membros ao longo do eixo anterior/posterior. Durante a organogênese, a expressão de Shh afeta o desenvolvimento da maioria dos tecidos epiteliais (INGHAM; PLACZEK, 2006; VARJOSALO; TAIPALE, 2008).

Em nível molecular, as diversas respostas celulares são afetadas pela indução de diferentes conjuntos de genes alvos. Entre os genes regulados pela sinalização Hh estão aqueles que codificam outras proteínas de sinalização, incluindo a Proteína Morfogênica Óssea 4 (BMP4), Fator de crescimento de fibroblastos 4 (FGF4) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de transcrição Myf5. Os genes que são induzidos por Hh em diversos tecidos e em torno deles, são geralmente envolvidos em um *feedback* positivo e negativo da via em si, e incluem Gli1 e Ptch1. As proteínas Gli agem como repressores na ausência de Hh e como ativadores na presença de Hh, muitos dos genes alvos também se comportam dessa forma (VARJOSALO; TAIPALE, 2008).

A sinalização Hh participa da regulação da miogênese através da manutenção de Myf5. Ao investigar a função do fator transcricional Gli na regulação de Myf5, Gustafsson et al. (2001) identificaram um *enhancer* que controla a atividade de Myf5 nos somitos epaxiais e caracterizaram a sua resposta na sinalização Shh. Este estudo mostrou que a sinalização de Shh controla a ativação deste *enhancer* nos progenitores do músculo epaxial durante a formação dos somitos e em células 3T3 (fibroblastos de camundongos), que responderam a indução de Shh. Além disso, a regulação do *enhancer* nos somitos e nas células 3T3 por Shh é mediada através de um sítio de ligação no fator de transcrição Gli.

Estes resultados demonstraram que Myf5 é alvo direto da sinalização de Shh a longo alcance no controle da especificação das células progenitoras dos somitos da linhagem miogênica epaxial. Nesses somitos, Myf5 responde a sinalização Shh através da regulação positiva de Gli, estabelecendo que a sinalização a longo alcance de Shh tem uma função transcricional direta na regulação de Myf5 para a especificação dos progenitores da musculatura epaxial (GUSTAFSSON et al., 2001).

A via de ação de Shh por muito tempo foi considerada silenciosa no desenvolvimento muscular pós-natal. No entanto, Straface et al. (2008) verificaram que Shh e Ptch1 são induzidos na regeneração do músculo após uma isquemia, sugerindo que a via de atuação do Shh em embriões pode ser reproduzida após o nascimento.

## 2.5 RT-PCR Quantitativa em Tempo Real

A RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq) é o método que faz uso da transcrição reversa (RT) seguida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a quantificação de transcritos, é muito sensível e pode ser utilizada para quantificar a expressão de RNAs mensageiros (RNAm) expressos em baixos níveis. Este procedimento permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um só passo (VANDESOMPELE et al., 2009; NOLAN et al., 2006; CIKOS et al., 2008).

Existem dois métodos para a quantificação utilizando a RT-PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. Na quantificação absoluta, o número de cópias de um determinado gene é determinado pela comparação dos dados obtidos para uma amostra com uma curva de calibração gerada a partir de reações com diluições sucessivas da amostra. Já a quantificação relativa determina o nível de expressão de um determinado gene comparando um tratamento em relação a outro, e para isso são utilizados genes constitutivos para a normalização dos resultados obtidos (PFAFFL, 2004).

A agilidade, praticidade e confiança nos dados levam ao uso da RT-PCRq em grande escala, no entanto, diversos fatores podem interferir no desempenho desta técnica (PFAFFL, 2009; RAMAKERS 2003). Nesse sentido, o uso correto da eficiência de amplificação e da normalização tem grande importância, permitindo resultados mais confiáveis ao final da expressão gênica relativa.

A eficiência de amplificação é importante no processo da quantificação da expressão gênica, uma vez que essa eficiência é baseada na suposição de que os produtos da PCR dobram a cada ciclo de amplificação. O valor da eficiência deve ser de aproximadamente 2.0 significando a duplicação do material genômico e correspondendo a 100% de eficiência (MEIJERINK et al., 2001; YUAN et al., 2008). No entanto, quando a eficiência não é 100%, a quantificação da expressão deve ser ajustada para a eficiência de amplificação obtida.

Existem diversos métodos disponíveis para calcular a eficiência de amplificação, mas o método mais acurado e que fornece eficiências mais precisas e realistas deve ser definido através de análises prévias para cada experimento em particular (PFAFFL, 2009). O método da curva padrão determina a eficiência de amplificação a partir de uma série de diluições conhecidas de cDNA. Nesse método o valor da eficiência é determinado a partir da inclinação da curva padrão (CIKOS et al., 2007; RASMUSSEN et al., 2001). Um método alternativo foi

desenvolvido por Ramakers et al. (2003). Esse método, intitulado LinRegPCR, usa um programa de computador que determina a quantidade de RNAm alvo e a eficiência de amplificação através de uma análise de regressão linear, utilizando os dados de fluorescência obtidos a partir da PCR em tempo real.

A normalização através do uso de genes referência é um método para o controle interno do erro experimental da RT-PCRq. Nesse caso, o gene de interesse e o gene de referência estão sujeitos às variações provenientes do todo o processo, desde o método de extração de RNA até a quantificação de transcritos, podendo controlar variações nas quantidades iniciais do ácido ribonucléico (BUSTIN et al., 2005). A normalização da RT-PCRq em tempo real é de grande importância e várias estratégias têm sido sugeridas para o sucesso da normalização de dados. Estas estratégias abrangem cuidados como utilização de mesma quantidade de amostra, eficiência da síntese de cDNA, escolha do gene referência e o modelo matemático de análise dos dados (BUSTIN et al., 2005).

Os genes referência, ou normalizadores, são genes constitutivos também conhecidos como *housekeeping*, ou seja, genes responsáveis por funções essenciais para a manutenção do funcionamento celular. Um gene referência ideal deve apresentar expressão constante nos diversos estádios de desenvolvimento, em diferentes células, tecidos e condições fisiológicas. Os genes referência mais utilizados são: *gliceroaldeído3 fosfato desidrogenase* (GAPDH), actinas e codificadores de subunidades ribossomais. No entanto, diversos estudos têm evidenciado que os níveis de transcrição não são constantes entre diferentes estágios de desenvolvimento e condições experimentais (MCCURLEY et al., 2008; PÉREZ et al., 2008; ZAROS et al., 2010), o que torna a seleção do gene referência uma tarefa trabalhosa.

Vários estudos utilizam genes referência sem prévia validação de sua expressão, gerando uma interpretação equivocada dos resultados. Para tentar contornar esta questão, existem programas disponíveis na *internet* que permitem testar genes referência ideais para cada experimento. O método ideal para a normalização é muito discutido e diversos métodos têm sido propostos para a normalização da expressão de genes alvos (VANDESOMPELE et al., 2002; PFAFFL et al., 2004; ANDERSEN et al., 2004; SZABO et al., 2004; De KOK et al., 2005, CHERVONEVA et al., 2010). O GeNorm é o programa mais utilizado, foi desenvolvido por Vandesompele et al. (2002). Este programa possibilita a escolha do gene referência, baseado na variação da média geométrica dos valores de expressão de genes candidatos a gene referência

obtidos na quantificação por PCR em tempo real. O programa GeNorm avalia a estabilidade da expressão de cada gene, determina o número ideal de genes necessários para a normalização e calcula o fator de normalização baseado nos níveis de expressão do melhor gene referência.

No meio científico, a normalização usando um único gene referência não é aceitável (VANDESOMPELE et al., 2009; CIKOS et al., 2008), a não ser que os pesquisadores apresentem provas claras que confirmem a sua expressão invariante sob as condições experimentais descritas. O número ótimo de genes a serem utilizados como e quais os genes que devem ser usados como referências devem ser definidos através de análises prévias para cada experimento em particular.





### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagens de Aves**

No presente estudo foram utilizadas aves de duas linhagens, uma de corte (TT) e uma de postura (CC), desenvolvidas pelo sistema de Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/SC. As linhagens apresentam composições genéticas distintas. A linhagem de corte teve sua origem a partir do cruzamento das raças *Cornish*, *Hamshire* e *White Plymouth Rock*, enquanto que a linhagem de postura foi originada da raça *White Leghorn*.

A linhagem TT é uma linha paterna de corte, cuja seleção foi efetuada dentro de linha com o objetivo de melhorar o peso corporal, conversão alimentar, rendimentos de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, redução da gordura abdominal e de doenças metabólicas. A linhagem CC foi selecionada para melhorar a produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e um reduzido peso corporal. Informações detalhadas sobre as referidas linhagens podem ser obtidas em Figueiredo et al. (2003 a,b).

#### **3.2 Incubação dos Ovos e Coleta de Tecidos**

Ovos férteis das linhagens TT e CC foram incubados a 37,8°C em atmosfera umidificada. As coletas da musculatura peitoral dos embriões foram realizadas após 9 e 17 dias de incubação. Já as amostras provenientes de animais pós-eclosão foram coletadas nos dias 1, 21 e 42 após a eclosão. A idade de 9 dias foi escolhida como inicial pelo fato da musculatura peitoral já estar formada no embrião e as idades seguintes foram escolhidas por abranger diferentes estádios de desenvolvimento do músculo peitoral de aves.

As amostras de tecido foram coletadas em microtubos, previamente identificados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em *freezer* -80°C até o momento da extração de RNA.

#### **3.3 Extração do RNA Total**

O isolamento do RNA total das amostras de tecido do músculo peitoral foi realizado segundo o protocolo descrito pela empresa fabricante do reagente TRIzol<sup>®</sup> (*Invitrogen*). Os tecidos foram macerados em 1 mL de TRIzol e incubados por cinco minutos a temperatura

ambiente. A esta mistura adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, sendo incubados por cinco minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C, a fase aquosa foi recuperada em um tubo novo. A este foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol seguindo-se de incubação por dez minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por dez minutos a 4 °C e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo procedida nova centrifugação a 10000 x g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi desidratado a temperatura ambiente e ressuspendido em 20  $\mu\text{L}$  de água-DEPC (0,01%) para posterior determinação da concentração de RNA total por espectrofotômetro. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1%. Feito isso, todas as amostras foram diluídas para a concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e em seguida 2  $\mu\text{L}$  (1,0  $\mu\text{g}$ ) foram utilizados para a síntese de cDNA.

### 3.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total das amostras de tecido do músculo peitoral e 1 $\mu\text{L}$  de *primer* oligo (dT) – 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e água livre de nucleases. Após incubação a 70°C por cinco minutos, a reação foi resfriada em gelo por cinco minutos. Ao serem retiradas do gelo, foram adicionados às amostras: 4  $\mu\text{L}$  de *Reaction Buffer 5 X*; 1,2 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM); 2 $\mu\text{L}$  de DTT 0,1 M, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (0,5 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de inibidor de nucleases e 1  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptase reversa. A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 minutos, procedendo-se a inativação da enzima a 70°C durante 15 minutos.

### 3.5 Desenho dos *Primers*

Os primers utilizados para a amplificação dos genes MyoD, Myf5, Miogenina, MRF4, Miostatina, GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), MRPS27 (*Mitochondrial ribosomal protein S27*) e Beta-actina foram desenhados por Marchesin (2008).

Os primers utilizados para a amplificação dos genes Shh, Ptch1, Smo, Sufu, Pka, Gli2, Gli3, Pax7, para os genes referência EEF (*Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*) e RPL5 (*Ribosomal protein L5*) foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro disponíveis no banco de dados *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Os *primers* foram construídos utilizando o programa Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi->

bin/primer/primer3\_www.cgi) e analisados quanto à sua qualidade através do programa Net Primer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>) (Tabela 1).

Para evitar que uma possível contaminação das amostras de cDNA com DNA genômico pudesse interferir na quantificação da expressão, os pares de *primers* foram desenhados entre éxons consecutivos intercalados por íntrons. Assim, a amplificação de DNA genômico, geraria um produto mais extenso, sendo facilmente identificável a contaminação.

Tabela 1- Identificação dos *primers* utilizados

<b>Gene</b>	<b>NCBI (GeneID)</b>	<b>Localização no gene</b>	<b>Seqüência dos <i>primers</i></b>	<b>Tamanho (pb)</b>
MyoD	374048	Exon 2	Direto: 5'- GCTTCAGCTGGAGGCAGTAT - 3'	123
		Exon 3	Reverso: 5'- ATCACCAAATGACCCAAAGC -3'	
Myf5	395633	Exon 2	Direto: 5'- AGAGAGGCGGTCCACGAT 3'	105
		Exon 3	Reverso: 5'- TTCGAGGCGGGCTACTGC -3'	
MRF4	417873	Exon 1	Direto: 5'- ACCTCCTGCATTTTGTCTG - 3'	136
		Exon 2	Reverso:5'- CTCTGAAAAGGCGGACTGTG - 3'	
Miogenina	374004	Exon 2	Direto:5'- ACGATGGAGGAGAGCGAGT - 3'	114
		Exon 3	Reverso:5'- ATCCTGCAGCCCTGAGTG - 3'	
Miostatina	373964	Exon 2	Direto: 5'- TGAGTGTGCGGGTATTTCTG 3'	100
		Exon 3	Reverso: 5' - CTTTGGATGGGACTGGATT - 3'	
Pax7	395942	Exon 5	Direto: 5'- TTTGAGAGGACCCACTACCC -3'	112
		Exon 6	Reverso: 5'- TTGCTGAACCACACCTGAAC -3'	
Shh	395615	Exon 2	Direto: 5'- GCTCCGTCAAAGCAGAAAAC - 3'	114
		Exon 3	Reverso:5'- CAGGGCTCAGGTCCTTCAC - 3'	
Ptch1	395806	Exon 4	Direto:5'- GCTGGGAAGAAATGCTGAA -3'	152
		Exon 5	Reverso:5'- GCATCCACCACTCAAACAA - 3'	
Smo	395949	Exon 3	Direto: 5'- CTTCAGCTCCGTCACCATCT - 3'	121
		Exon 4	Reverso: 5'- CACAAAGAAGCAGGCATTGA - 3'	
Pka	417438	Exon 6	Direto: 5'- CACTTACATTGCAGGCGAGA - 3'	115
		Exon 8	Reverso: 5'- AACACTGGTTGCCCACTCAT - 3'	
Sufu	374118	Exon 2	Direto: 5'- TCCTGAGCACTGGCACTATG -3'	93
		Exon 3	Reverso: 5'- CCACTTGGTCCATCTGTTCC -3	
Gli2	395956	Exon 3	Direto: 5'- AGCACTACCTCCGCTCTGTC - 3'	106
		Exon 4	Reverso:5'- CCTCGCTCCTTCAGATGCT - 3'	
Gli3	420769	Exon 3	Direto:5'- CCATCCCTGTCCATGATCTC -3'	138
		Exon 4	Reverso:5'- AGGAATGATGTCTGCGTAAGG -3'	

Tabela 1- Identificação dos *primers* utilizados

Gene	NCBI (GeneID)	Localização no gene	Seqüência dos primers	(conclusão)
				Tamanho (pb)
Beta - actina	396526	Exon 1	Direto: 5'- ATGAAGCCCAGAGCAAAAGA 3'	134
		Exon 2	Reverso: 5'- CTCCTCAGGGGCTACTCTCA - 3'	
EEF1	373963	Exon 3	Direto: 5'- TTCCACTGAGCCACCTTACA - 3'	184
		Exon 4	Reverso: 5'- GGTAACCTTCCATCCCTTGA - 3'	
GAPDH	374193	Exon 7	Direto: 5'- TGGAGAGATGGCAGAGGTG - 3'	142
		Exon 8	Reverso: 5'- AACAGAGACATTGGGGGTTG - 3'	
MRPS27	427216	Exon 6	Direto: 5'- GCTTGTTCTTGCTCCCACTC - 3'	102
		Exon 7	Reverso: 5'- TAACCCTGACCACCCAACCTC - 3'	
RPL5	395269	Exon 4	Direto: 5'- GTTTTTGGTGCTCTGAAGGG - 3'	180
		Exon 5	Reverso: 5'- AGCATCTTCATCCTCCTCCA - 3'	

### 3.6 RT-PCR Quantitativa em Tempo Real

A técnica de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) em tempo real foi utilizada para quantificar a expressão dos fatores miogênicos (MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4), Pax7 e Miostatina, também dos genes que fazem parte da via de ação Shh (Shh, Ptch1, Smo, Pka, Sufu, Gli2 e Gli3) e dos genes referência EEF1, GAPDH, MRPS27, RPL5 e Beta-actina. Para cada gene foi avaliado um total de 90 animais distribuídos nas duas linhagens de corte (TT) e postura (CC) e em cinco estádios de desenvolvimento: 9 e 17 dias da fase embrionária e 1, 21 e 42 dias da fase pós-eclosão.

A análise da expressão dos genes foi realizada utilizando-se o equipamento *LightCycler® 480 (Roche)*. Cada reação foi preparada com 2µL de cDNA na diluição 1:4, 10µL de *SYBR Green I Master (Roche) 2X*, 2 µL de cada *primer* (2 µM/µL), totalizando um volume final de 20 µL. As condições da reação para todos os pares de *primers* foram: incubação de 95°C por 2 minutos; 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 6 segundos; e extensão final de 72°C por 3 segundos. Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada gene entre as temperaturas 75°C a 95°C. Todo o experimento de PCR em tempo real incluiu uma amostra como controle negativo (sem cDNA) e um calibrador, que foi a amplificação de um gene conhecido (MRPS27) a partir de uma alíquota do *pool* de cDNA das 90 amostras. Os

resultados da expressão gênica foram gerados e registrados como valores de Cq (*Quantification cycle*).

### 3.7 Análise da Expressão Gênica

#### 3.7.1 Eficiência de Amplificação

Neste estudo foram utilizados a curva de diluição (RASMUSSEN, 2001) para determinar a eficiência de cada gene e o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003) para determinar a eficiência individual das amostras. A eficiência de amplificação dos genes foi calculada a partir de uma curva de diluição em série de cDNA (*pool* das 90 amostras). A curva padrão foi composta de duplicatas de quatro diluições seriais ( $2^{-1}$ ,  $2^{-2}$ ,  $2^{-3}$  e  $2^{-4}$ ) do cDNA. A partir dos resultados obtidos, foi construído um gráfico do Cq *versus* o  $\log_{10}$  das concentrações da diluição em série. Foi feita então uma regressão linear para determinar o coeficiente angular da reta (*slope*), que foi usado no cálculo da eficiência de amplificação utilizando-se a equação (1) determinada por Rasmussen (2001).

$$\text{Eficiência (E)} = [10^{(-1/\text{slope})}] \quad (1)$$

A eficiência individual de cada amostra foi calculada utilizando-se o programa LinRegPCR, utilizando no mínimo quatro pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial (RAMAKERS et al., 2003). Os dados de fluorescência obtidos no equipamento LightCycler® 480 (Roche) foram exportados para o programa LinRegPCR. Este programa utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de RNAm ( $R_0$ ) e a eficiência de amplificação (E) usando as equações 2, 3 e 4. Através do programa LinRegPCR os valores de Cq foram determinados para cada amostra.

$$\log R = \log (E + 1) \times n + \log R_0; \quad \text{intercept} = \log R_0, \text{ slope} = \log [E + 1] \quad (2)$$

$$R_0 = 10^{\text{Intercept}} \quad (3)$$

$$E = 10^{\text{Slope} - 1} \quad (4)$$

A partir da eficiência individual das amostras obtida pelo programa LinRegPCR foi adotado um procedimento para a correção para uma eficiência geral, definida em 2.0 (Equação 5).

$$Cq_{2ij} = \log_2(E\_gene_{ij}^{Cq\_gene(ij)}) \quad (5)$$

em que:

$Cq_{2ij}$  é Cq da amostra ij corrigido para eficiência 2.0

$E\_gene_{ij}^{Cq\_gene(ij)}$  é a eficiência real calculada pelo LinRegPCR elevado ao Cq da amostra para o gene ij

### 3.7.2 Normalização dos Dados

Foram utilizadas duas abordagens para a seleção do melhor fator de normalização de dados gerados na RT-PCR quantitativa. Na primeira análise os valores de Cq corrigidos (CqC) dos 5 genes referência (Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5) foram expressos em quantidade relativa (Q) usando a equação (6) e processadas usando o programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002), que indicou quais combinações de genes deveriam ser usadas como fator de normalização através do uso de sua média geométrica.

$$Q = E^{(Cq_{\text{mínimo}} - Cq_{\text{amostra}})} \quad (6)$$

Na segunda análise, os valores de CqC dos genes referência (Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5) foram estimados, considerando um modelo matemático misto, com um efeito aleatório associado à variabilidade natural do indivíduo amostrado. Uma abordagem de modelos mistos, usando a Equação 7.

$$y_{ij} = \mu + g_i + a_j + e_{ij} \quad (7)$$

em que:

$y_{ij}$  é o Cq na base 2 observado para o gene referência i no animal j;

$\mu$  é a média geral dos Cq;

$g_i$  é o efeito fixo do  $i$ th gene referência ( $i=1, \dots, 5$ );

$a_j$  é o efeito aleatório associado ao animal considerando  $a_j \sim \text{NID}(0, \sigma_a^2)$ ;

$e_{ij}$  é o efeito aleatório residual, com  $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$ .

A partir deste modelo, foram obtidos os valores *BLUP* (*best linear unbiased predictor*) para o efeito animal, sendo estes considerados como os fatores de ajustes dos valores Cq dos genes alvo.

### 3.7.3 Análise Estatística

Para a quantificação relativa, os dados de expressão dos genes, Myod, Myf5, Miogenina, MRF4, Pax7, Miostatina, Shh, Ptch1, Smo, Sufu, Pka, Gli2, Gli3, foram submetidos à análise de variância (Equação 8), seguido pelo teste Tukey para comparação de médias.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + L_j + (A \times L)_{ij} + e_{ijk} \quad (8)$$

Em que:

$Y_{ijk}$  = são os valores de Cq normalizados;

$\mu$  = média geral;

$A_i$  = efeito fixo idade;

$L_j$  = efeito fixo da linhagem;

$A \times L_{ij}$  = efeito fixo da interação idade e linhagem;

$e_{ijk}$  = erro aleatório





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração de RNA total

Após a obtenção do RNA total, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, onde foi possível verificar a integridade das amostras pela presença das bandas estruturais de RNA ribossômico (28S, 18S e 5,8S). Na Figura 4 podem ser visualizadas amostras de RNA total das linhagens de corte (TT) e postura (CC), nos seguintes estádios de desenvolvimento: 9 dias embrionário (E9d), 17 dias embrionário (E17d), 1 dia pós-eclosão (PE1d), 21 dias pós-eclosão (PE21d) e 42 dias pós-eclosão (PE42d).

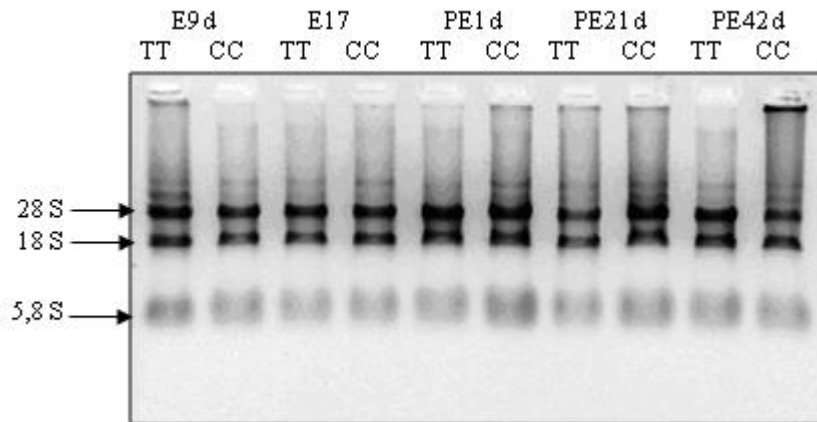


Figura 4 – Gel de agarose (1%) para verificação da integridade do RNA total das linhagens TT e CC em diferentes estádios de desenvolvimento, podendo-se visualizar as bandas estruturais de RNA ribossômico (28S, 18S e 5,8S). Amostras: 9 dias embrionário (E9d), 17 dias embrionário (E17d), 1 dia pós-eclosão (PE1d), 21 dias pós-eclosão (PE21d) e 42 dias pós-eclosão (PE42d)

### 4.2 Especificidade dos *Primers* e Eficiência de Amplificação

As condições ótimas de amplificação para cada um dos genes foram estabelecidas e a especificidade da reação para cada um dos *primers* foi verificada pela temperatura de *melting* e por eletroforese em gel de agarose, onde foi observada a presença de uma banda única correspondente ao tamanho esperado do produto amplificado de cada um dos genes. Na Figura 5 pode ser visualizado o fragmento esperado para os genes, *Gli2*, *Gli3*, *Pka*, *Smo* e *Sufu*.

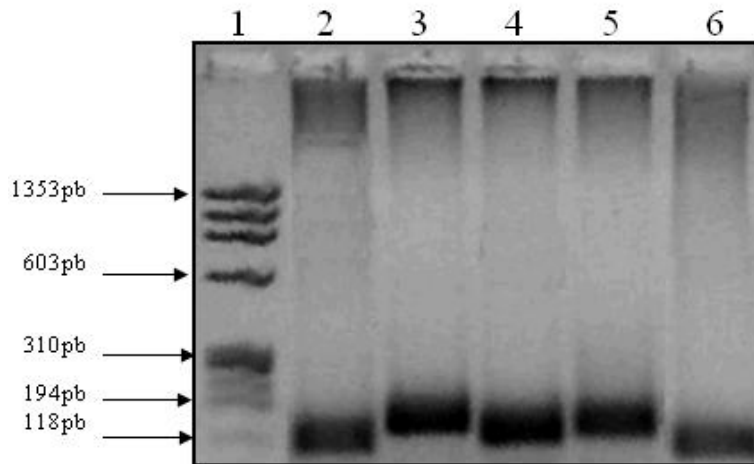


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos fragmentos amplificados. 1- Padrão de peso molecular  $\phi$ x 174 (*Invitrogen*), 2-Gli 2 (106pb), 3- Gli3 (138 pb), 4- Pka (115 pb), 5- Smo (121 pb), 6- Sufu (93 pb)

A análise da temperatura de *melting* para cada um dos genes foi realizada pelo *software* do equipamento *LightCycler® 480 (Roche)*. Esta análise permite verificar a qualidade da reação, a ausência de contaminantes ou a geração de produtos inespecíficos. A temperatura de *melting* avalia a dissociação da fita dupla de DNA com o aumento da temperatura, e o produto presente na reação é considerado específico quando apenas um pico ou temperatura de *melting* é gerado. A temperatura de *melting* é definida quando a curva atinge seu platô, uma representação da curva de *melting* é apresentada na Figura 6. Na Tabela 2 são apresentadas as temperaturas de *melting* para todos os genes estudados.

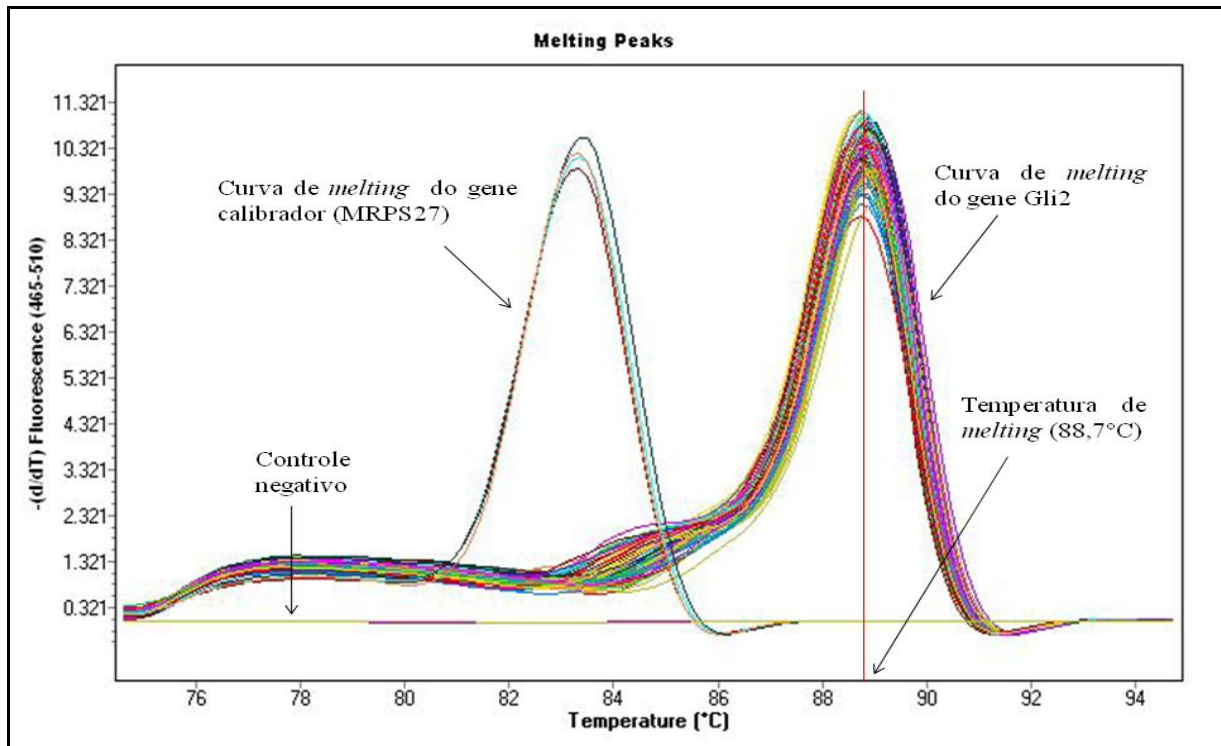


Figura 6 – Curva de *melting* para o gene calibrador (MRPS27) e o gene Gli2. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada

Tabela 2 – Temperaturas de *melting* de cada um dos genes analisados

Gene	Temperatura de melting (°C)
Miogenina	87,6
MyoD	83,1
MRF4	88,2
Myf5	90,3
Miostatina	79,0
Pax7	85,0
Shh	87,0
Ptch1	81,3
Smo	84,7
Pka	79,7
Sufu	80,0
Sufu	80,0
Gli2	88,7
Gli3	86,7

Tabela 2 – Temperaturas de *melting* de cada um dos genes analisados

(Conclusão)

Gene	Temperatura de melting (°C)
EEF1	83,4
GAPDH	85,8
MRPS27	83,3
RPL5	83,4
Beta-actina	82,0

A eficiência de amplificação dos genes Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5 foi calculada pelo *software* do equipamento LightCycler® 480 (Roche) a partir de uma curva de diluição em série de cDNA. Os genes apresentaram eficiências entre 1,8 a 2,0. Uma representação da curva de diluição é apresentada na Figura 7. Enquanto que a eficiência individual de cada amostra foi calculada utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os valores de eficiência variaram de 1,6 a 2,0. Uma representação contendo as 90 amostras cuja eficiência foi determinada pelo programa LinRegPCR é apresentada na Figura 8.

Segundo Meijerink et al. (2001), para que a RT-PCR quantitativa seja confiável e reprodutível, as amplificações devem apresentar perto de 100% de eficiência a cada ciclo de reação. O valor da eficiência deve ser de aproximadamente 2.0 significando a duplicação do material genômico a cada ciclo de amplificação e correspondendo a 100% de eficiência. No presente estudo observou-se que o programa LinRegPCR gerou eficiências menores quando comparadas as eficiências obtidas pelo métodos de curva de diluição. Segundo Cikos et al. (2007) e Pfaffl, (2006) a eficiência determinada pelo programa LinReg é subestimada enquanto que a curva de diluição superestima os valores de eficiência.

O programa LinRegPCR tem sido amplamente utilizado para estimar a eficiência de amplificação, pois é rápido e utiliza as mesmas amostras cuja expressão foi quantificada, sendo ideal para experimentos que possuem quantidade limitada de RNA. No entanto, o método da curva de diluição deve ser mantido, podendo ser usado em conjunto, segundo Bustin (2009), este método é confiável, transparente e informativo tanto para determinar a eficiência de amplificação, como para a abundância relativa da expressão do gene. Além disso, a curva de diluição pode ser utilizada como um controle positivo e ajuda a definir as variações e os limites de detecção do equipamento.

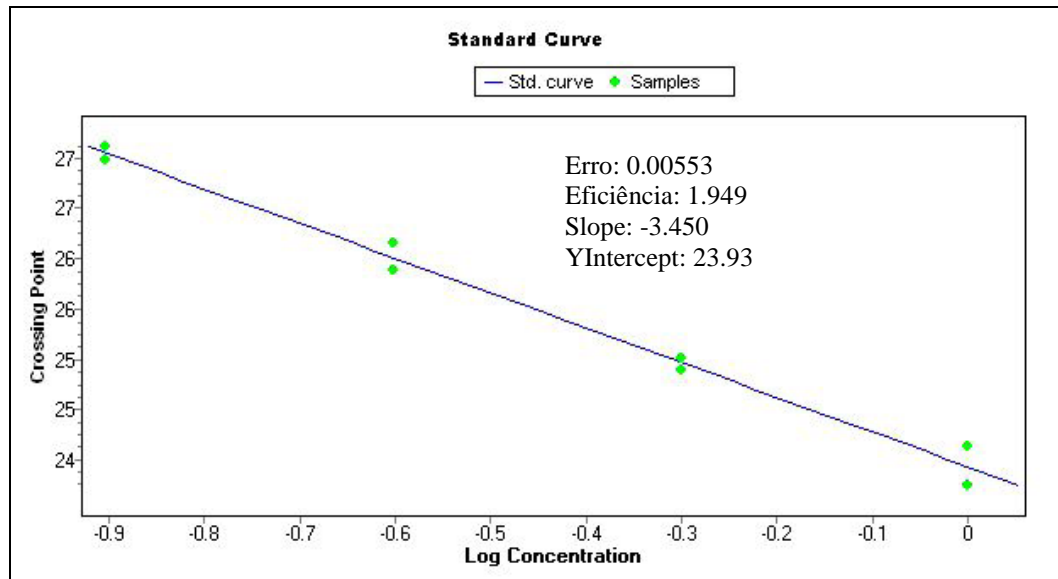


Figura 7 – Curva de diluição gerada para o gene MRPS27

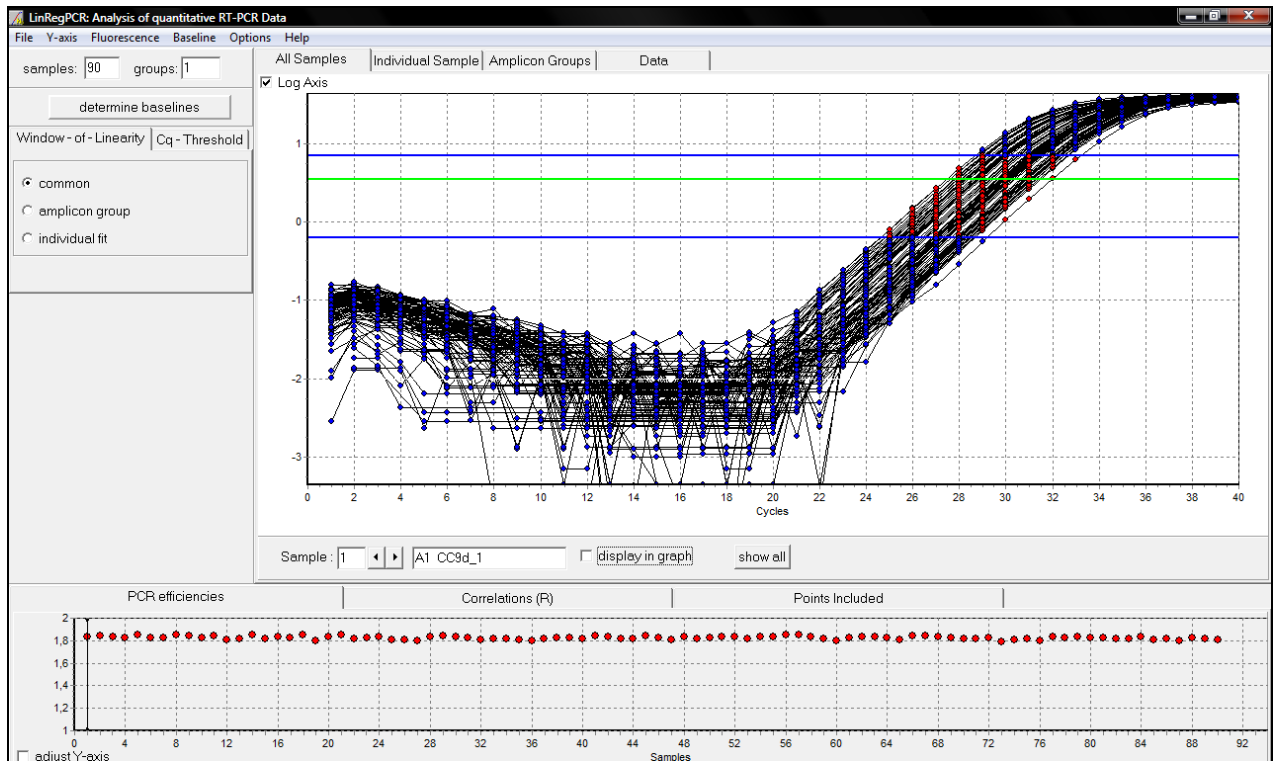


Figura 8 – Curva de amplificação demonstrada pelo programa LinRegPCR

A vantagem do uso das eficiências individuais é que caso alguma amostra em particular analisada possua um fator de inibição influenciando a sua eficiência de amplificação, esta amostra poderá ser identificada e excluída das análises (RUTLEDGE; DON STEWART, 2008). Enquanto que no método da curva de diluição não é possível, pois devido ao alto custo e tempo, a curva de diluição é realizada para verificar a eficiência de amplificação do gene e não da amostra individual (PFAFFL, 2009). Neste estudo utilizamos a correção da eficiência de amplificação individual de cada amostra, gerada pelo programa LinRegPCR, para uma eficiência 2,0.

### **4.3 Normalização e Análise dos dados**

A normalização de dados mensurados pela técnica de RT-PCR quantitativa por meio do uso de genes referência é atualmente o método mais aceitável para corrigir possíveis variações geradas durante a extração de RNA total, síntese de cDNA e a quantificação. Logo, uma atenção especial deve ser dada a escolha do gene de referência e do modelo matemático para a análise dos dados.

No presente estudo foi investigada a estabilidade de expressão dos genes referência potenciais: Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5, frequentemente utilizados para a normalização de dados em estudos de expressão gênica. Estes genes fazem parte de diversos processos biológicos, por exemplo, o gene Beta-actina está envolvido na motilidade, estrutura e integridade celular, o EEF1 participa na alongação da tradução, o GAPDH está envolvido na iniciação da tradução, o MRPS27 na síntese de proteínas mitocondriais e o RPL5 na síntese de proteínas no citoplasma.

Diversos autores (BUSTIN et al., 2005; VANDESOMPELE et al., 2009; CIKOS et al., 2008, ZAROS et al., 2010) relataram que a utilização de um único gene referência para a normalização não é aceitável e recomendam o uso de múltiplos genes referência como fator de normalização. Nesse sentido, em busca da correta análise dos dados de expressão gênica, foram utilizadas duas abordagens de normalização. Na primeira, os dados foram processados pelo programa GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e na segunda, o modelo novo de análise como descrito no item 3.7.2.

### 4.3.1 GeNorm

A estatística do programa GeNorm foi a primeira abordagem utilizada para avaliar os genes referência. Este programa calcula a estabilidade de expressão (M) para cada gene baseado na relação entre a expressão média dos pares entre um gene e cada um dos outros genes em estudo. O GeNorm realiza então uma exclusão gradual do gene menos estável e recalcula o valor de M e indica os 2 genes com expressão mais estável (Figura 9). Dos genes estudados, somente *EEF1A1* e *MRPS27* apresentaram o valor de M dentro do limite de <1,5 sugerido pelo GeNorm, enquanto que os genes, *GAPDH*, *Beta-actina* e *RPL5* apresentaram alto valor de M, indicando que estes genes não devem ser utilizados na normalização de dados.

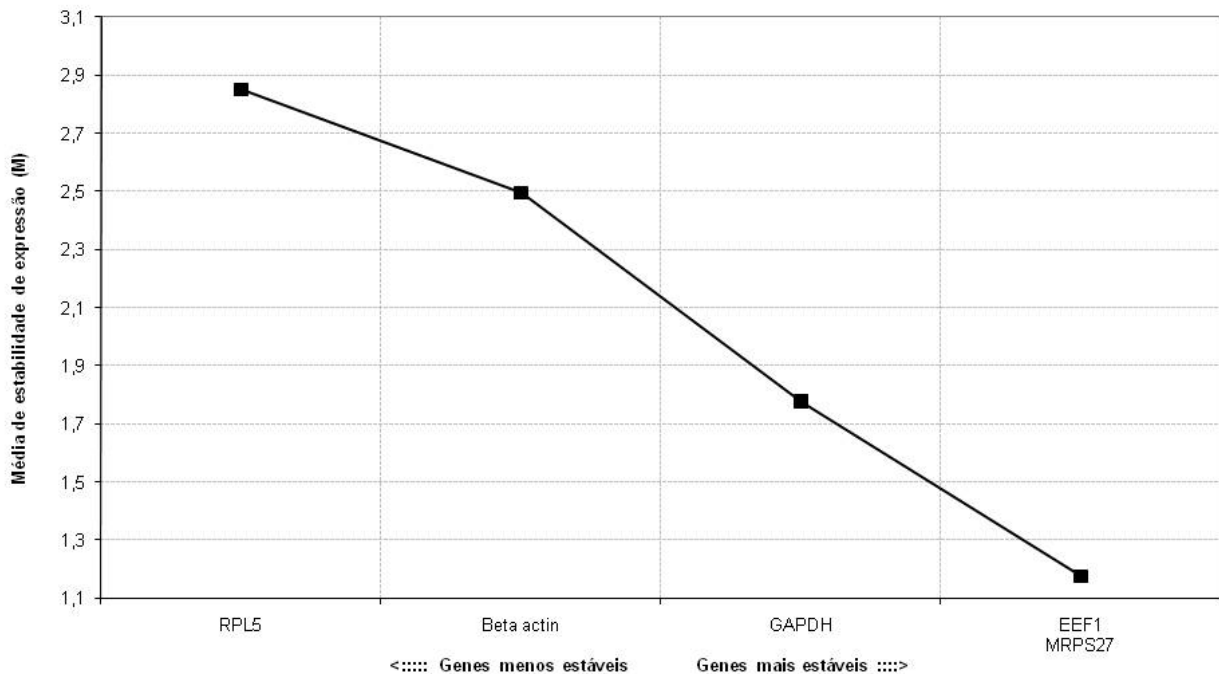


Figura 9 - Seleção da melhor combinação de genes referência pelo GeNorm

### 4.3.2 Correlação

Neste estudo foi proposta uma nova metodologia de normalização, o uso de valores BLUP como fator de correção dos valores de Cq dos genes alvos. Para averiguar as mudanças e particularidades deste novo método, foram calculadas as correlações entre os valores BLUP dos Cqs dos genes referência e entre a média geométrica dos Cqs dos genes referência e os valores BLUP.



As correlações foram obtidas usando o conjunto ou um subconjunto de genes referência, que quando compostos pelos valores da média geométrica (mgeo) dos genes referência foram denominados: mgeo1 (Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5), mgeo2 (EEF1 e GAPDH) mgeo3 (RPL5 e GAPDH e beta-actin) mgeo4 (EEF1 e RPL5) mgeo5 (EEF1 e MRPS27). Os valores BLUP dos genes referência foram denominados: BLUP1 (Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5), BLUP2 (EEF1 e GAPDH) BLUP3 (RPL5 e GAPDH e Beta-actina) BLUP4 (EEF1 e RPL5) BLUP5 (EEF1 e MRPS27).

As correlações entre os valores BLUP foram positivas e altas, apresentando  $p > 0,0001$  (Tabela 3). A alta correlação,  $r = 0,975$ , encontrada entre BLUP1, valor de BLUP dos cinco genes referência (Beta-actina, EEF1, GAPDH, MRPS27 e RPL5) e BLUP3, valor de BLUP de 3 genes referência (RPL5, GAPDH e Beta-actina) é indicativo da potencial aplicabilidade de BLUP usando 3 genes referência para a obtenção do fator de normalização das medidas de expressão gênica. Alta correlação,  $r = 0,814$ , também foi observada entre BLUP1 e BLUP5, composta pelos genes referência EEF1 e MRPS27 indicados pelo GeNorm.

Tabela 3 – Correlação entre os valores BLUP

	<b>BLUP1</b>	<b>BLUP2</b>	<b>BLUP3</b>	<b>BLUP4</b>	<b>BLUP5</b>
<b>BLUP1</b>	1,000	0,892	0,976	0,930	0,815
		$p < ,0001$	$p < ,0001$	$p < ,0001$	$p < ,0001$
<b>BLUP2</b>		1,000	0,862	0,714	0,769
			$p < ,0001$	$p < ,0001$	$p < ,0001$
<b>BLUP3</b>			1,000	0,956	0,670
				$p < ,0001$	$p < ,0001$
<b>BLUP4</b>				1,000	0,622
					$p < ,0001$
<b>BLUP5</b>					1,000

Na Tabela 4 é apresentada a correlação entre a média geométrica (mgeo) e os valores BLUP dos genes referência. A alta correlação,  $r = 0,813$  ( $p < 0,0001$ ), encontrada entre BLUP3 e mgeo3 é indicativo da potencial aplicabilidade dos valores de BLUP usando 3 genes referência para a obtenção do fator de normalização das medidas de expressão gênica. A correlação entre BLUP5 e mgeo5, ambas compostas pelos genes *EEF1* e *MRPS27* selecionados pelo GeNorm, foi  $r = 0,555$  ( $p < 0,0001$ ).

Tabela 4 – Correlação entre média geométrica (mgeo) e valores BLUP

	<b>BLUP1</b>	<b>BLUP2</b>	<b>BLUP3</b>	<b>BLUP4</b>	<b>BLUP5</b>
<b>mgeo1</b>	0,756	0,685	0,741	0,699	0,599
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
<b>mgeo2</b>	0,497	0,444	0,491	0,491	0,383
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0002$
<b>mgeo3</b>	0,794	0,723	0,814	0,760	0,549
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
<b>mgeo4</b>	0,434	0,334	0,446	0,466	0,291
	$p < 0,0001$	$p < 0,0013$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0054$
<b>mgeo5</b>	0,527	0,470	0,454	0,443	0,555
	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

Com o intuito de agilizar a análise dos dados de expressão, a presente análise de normalização foi realizada anteriormente a análise de correlação. Assim, optou-se por normalizar os dados de expressão dos genes, *Myod*, *Myf5*, *MRF4*, *Miogenina*, *Pax7*, *Miostatina*, *Shh*, *Ptch1*, *Smo*, *Sufu*, *Pka*, *Gli2*, *Gli3*, utilizando BLUP1, que contém os cinco genes referência (*Beta actina*, *EEF1*, *GAPDH*, *MRPS27* e *RPL5*).

#### 4.4 Expressão Relativa dos Fatores Miogênicos, Miostatina e Pax7

Os resultados da análise de variância da expressão gênica dos genes, *Myod*, *Myf5*, *MRF4*, *Miogenina*, *Pax7* e *Miostatina* são apresentados na Tabela 5.

O efeito de idade foi significativo para *MyoD* e *Miostatina*, já o efeito da interação idade e linhagem foi significativo para os genes, *Miogenina*, *Myf5*, *MRF4* e *Pax7*, indicando dependência entre esses efeitos.

Tabela 5 – Probabilidades obtidas na análise de variância para os genes MyoD, Myf5, MRF4, Miogenina, Pax7 e Miostatina

Gene	n	Idade	Linhagem	Idade x Linhagem
MyoD	9	0,0248	0,4043	0,3885
Myf5	9	<0,0001	0,2739	0,0147
MRF4	9	0,0003	0,2948	<0,0001
Miogenina	9	<0,0001	0,0017	<0,0001
Pax7	9	<0,0001	0,5836	0,0013
Miostatina	9	<0,0001	0,4983	0,1875

#### 4.4.1 Ontogenia da expressão dos Fatores Miogênicos, Miostatina e Pax7

Os genes MyoD e Miostatina apresentaram diferença significativa entre as idades, na ontogenia, e não apresentaram diferença significativa entre as linhagens. É importante salientar que quanto mais baixo o valor de Cq, mais cedo ocorreu a detecção do RNAm do gene, conseqüentemente havendo maior expressão gênica. Na Tabela 6 são apresentados os resultados da expressão dos genes MyoD e Miostatina nos estádios de desenvolvimento embrionário e pós-eclosão.

Os fatores regulatórios da miogênese atuam no controle da formação da musculatura esquelética e sua expressão tem sido usada tanto como indicativo de desenvolvimento muscular como de regeneração (BUCKINGHAM et al., 2003; SHI; GARRY, 2006). Na ontogenia, a expressão do RNAm de MyoD aos 9 dias da idade embrionária não diferiu das demais idades ( $p > 0,05$ ), no entanto nas idades 17 dias embrionária e 1 dia pós-eclosão apresentaram maior expressão em relação aos 21 dias pós-eclosão ( $p < 0,05$ ). Aos 42 dias pós-eclosão não houve diferença da expressão em relação às demais idades ( $p > 0,05$ ). A expressão de MyoD apresentou uma redução de  $2,0 \pm 1,21$  vezes no dia PE21 (21 dia pós-eclosão) em relação aos dias E17 (17 dias embrionário) e PE1 (1 dia pós-eclosão).

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Li et al. (2010), que estudaram o perfil de expressão de MyoD no músculo peitoral de patos (*Anas platyrhynchos Domestica*) durante o desenvolvimento embrionário e neonatal. Foi observado um pico de expressão no dia (E27) anterior a eclosão e um declínio na expressão aos sete dias pós-eclosão. O mesmo perfil de expressão foi observado no músculo das pernas dos patos, no entanto mais baixo.

De acordo com análise de *Western blotting* realizada por Puri; Sartorelli (2000), a proteína de MyoD é expressa em células indiferenciadas e diferenciadas. Durante o estágio embrionário, MyoD dirige a proliferação das células precursoras miogênicas em direção a linhagem muscular esquelética (BERKES; TAPSCOTT, 2005). Quando os animais nascem, MyoD controla a entrada das células satélites no ciclo celular, proliferação e fusão em miofibras, promovendo assim a hipertrofia muscular (COOPER et al., 1999).

Tabela 7 – Expressão do RNAm, valores de Cq (*Quantification cycle*), dos genes MyoD, Miostatina, Myf5, MRF4, Mioigenina e Pax7 nos estágio de desenvolvimento embrionário e pós-eclosão

Gene	Linhagem	Idade					Erro Padrão
		E9	E17	PE1	PE21	PE42	
MyoD		* 24,5ab	23,9a	23,9a	24,9b	24,6ab	0,27
Miostatina		27,6c	24,7a	27,6c	25,9b	26,4b	0,13
Myf5	CC	27,5aA	29,0bA	29,6bA	31,7cB	29,4bA	0,24
	TT	28,2aA	28,6abA	29,3bA	30,7cA	29,6bA	
MRF4	CC	26,3bA	26,6bB	26,2bA	25,6abA	24,9aA	0,27
	TT	26,5bA	24,9aA	25,6abA	26,4bB	25,3abA	
Mioigenina	CC	25,6aA	26,5abA	29,2cA	29,7cA	27,3bA	0,27
	TT	25,6aA	26,6aA	29,9bA	29,2bA	29,8bB	
Pax7	CC	25,5aA	25,5aA	27,5bB	28,8cA	27,3bA	0,22
	TT	25,8aA	25,1aA	26,8bA	28,9cA	28,5cB	

CC – Linhagem de postura, TT – Linhagem de corte, E9 - 9 dias embrionário, E17 - 17 dias embrionário, PE1 - 1 dia pós-eclosão, PE21 - 21 dias pós-eclosão, PE42 - 42 dias pós-eclosão. \* - Valor de Cq baixo significa maior expressão gênica. Valores seguidos de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna dentro de gene não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

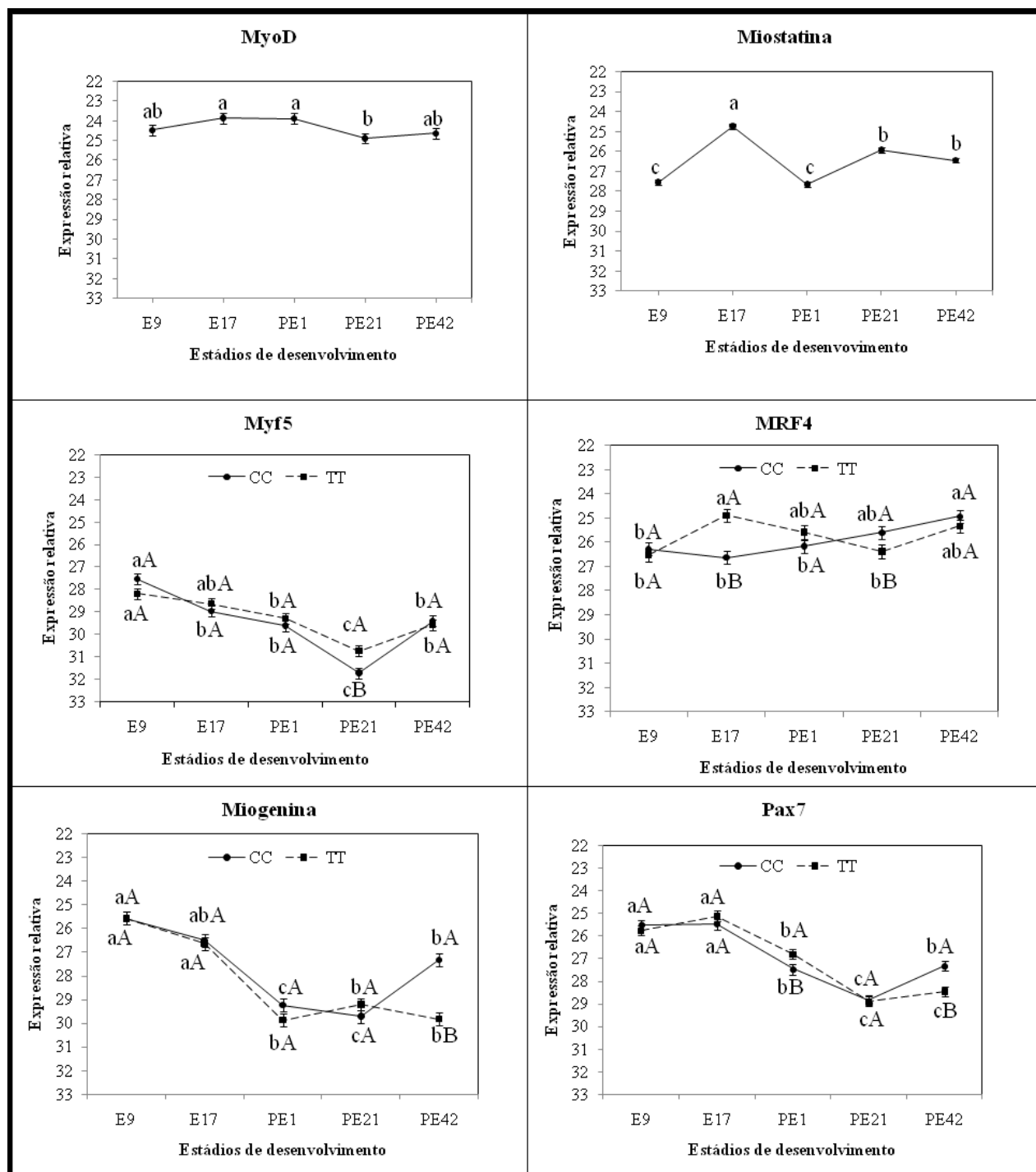


Figura 11 - Expressão relativa dos genes MyoD, Miostatina, Myf5, MRF4, Miogenina e Pax7. CC – Linhagem de postura, TT – Linhagem de corte, E9 - 9 dias embrionário, E17 - 17 dias embrionário, PE1 - 1 dia pós-eclosão, PE21 - 21 dias pós-eclosão, PE42 - 42 dias pós-eclosão. Valor baixo da expressão relativa significa maior expressão gênica. Valores seguidos de mesma letra minúscula nos estádios de desenvolvimento e letras maiúsculas entre as linhagens, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

No presente estudo, foi observado que MyoD se comporta da mesma maneira na linhagem de corte e de postura, sugerindo uma ação semelhante de MyoD, incluindo a determinação dos mioblastos, formação de miotubos e a formação das miofibras, durante os estádios de desenvolvimento muscular estudados.

Na ontogenia, observou-se que o RNAm de Miostatina foi menos expresso aos 9 dias do estágio embrionário, atingindo maior nível de expressão aos 17 dias do estágio embrionário, já nos estádios pós-eclosão, no dia 1 houve um declínio da expressão, apresentando o mesmo nível de expressão do estágio E9, aumentando novamente aos 21 dias e mantendo o nível de expressão aos 42 dias (Tabela 6 e Figura 10). Foi observado um declínio na expressão do RNAm de Miostatina de  $7,5 \pm 1,10$  vezes do dia E17 ao dia PE1.

Analisando a ontogenia de Miostatina no período embrionário de galinhas, por RT-PCR semiquantitativa, Scheuermann et al. (2004) também observaram níveis mais baixos de expressão de Miostatina no período correspondente a formação dos mioblastos secundários (E8 – E12) e um aumento da expressão no período próximo a eclosão (E17). Guernec et al. (2003) quantificaram o gene da Miostatina em estádios embrionários e pós-eclosão de galinhas utilizando PCR em tempo real. Esses autores obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo, verificando que no estágio embrionário houve um baixo nível de expressão aos 14 dias e aumento aos 17 dias. No período pós-eclosão houve queda da expressão no dia da eclosão, apresentando um aumento da expressão aos 28 dias e queda da aos 42 dias.

Mott; Ivarie (2002) estudando o gene da Miostatina em linhagens de corte e de postura identificaram duas mutações silenciosas na linhagem de postura e os mesmos níveis da proteína nas duas linhagens. Nos estudos de expressão usando *Northern blotting*, verificaram que o gene foi pouco expresso aos 10 dias da fase embrionária, aumentou a expressão aos 18 dias embrionário e no dia 10 pós-eclosão foi novamente pouco expresso.

No final do estágio embrionário a Miostatina é altamente expressa em diversos grupos musculares. Este alto nível de expressão indica uma redução na proliferação de mioblastos e uma regulação negativa do crescimento muscular (AMTHOR et al., 2002). Segundo estes mesmos autores, pode-se especular que o tamanho muscular (hipertrofia) deve ser restrito durante o desenvolvimento embrionário para evitar a superprodução de músculo, mantendo a possibilidade de criar mais massa muscular e com o intuito de adaptação às novas condições após a eclosão. Desta maneira, o alto nível de RNAm de Miostatina detectado próximo a eclosão é

devido ao controle necessário para a regulação do desenvolvimento muscular do animal, considerando a limitação do espaço no ambiente do ovo.

A Miostatina é um regulador negativo da regeneração e crescimento muscular, age mantendo as células satélites quiescentes, portanto, a ausência de miostatina acelera a regeneração muscular (MCCROSKERY et al., 2005). Nesse sentido, o baixo nível de expressão de Miostatina tanto nas aves de corte como nas de postura, após a eclosão, pode ser responsável pela ativação das células satélites, resultando em um aumento do número de mionúcleos, envolvidos no mecanismo molecular que regula a hipertrofia muscular.

Os genes Myf5, MRF4, Miogenina e Pax7 apresentaram na interação entre idade e linhagem. Primeiramente será discutida somente a ontogenia da expressão destes genes. Na Tabela 6 são apresentados os resultados da expressão dos genes Myf5, MRF4, Miogenina e Pax7 nos estádios de desenvolvimento embrionário e pós-eclosão nas linhagens de postura (CC) e de corte (TT).

Durante a ontogenia de Myf5, a linhagem de postura apresentou maior nível de expressão aos 9 dias da idade embrionária, um declínio aos 17 dias que manteve-se até o dia 1 pós eclosão, seguida por um novo declínio aos 21 dias e um aumento aos 42 dias pós eclosão, apresentando o nível de expressão igual ao E17 e PE1 (Tabela 6 e Figura 10), o declínio da expressão do dia E9 em relação ao dia PE21 foi de  $18,4 \pm 1,20$  vezes. A linhagem de corte apresentou o mesmo perfil de expressão da linhagem de postura (Tabela 6 e Figura 10), no entanto o declínio da expressão do dia E9 em relação ao dia PE21 foi de  $5,6 \pm 1,20$  vezes.

Ferri et al. (2009) pela análise de *Western blotting* verificaram que o nível de expressão da proteína Myf5 diminuiu em células C2C12 após a indução da diferenciação. A regulação negativa da proteína e do RNAm de Myf5 sugere que este perfil de expressão seja necessário determinar a proliferação e para o início da diferenciação celular (LINDON et al., 1998, FERRI et al., 2009).

Na ontogenia de MRF4 dentro da linhagem de postura, observou-se baixo nível de expressão aos 9 dias do estágio embrionário. Este nível manteve-se nos dias 1 e 21 pós-eclosão e o maior nível de expressão foi observado aos 42 dias pós-eclosão. Foi observado um aumento de  $3,2 \pm 1,20$  vezes no dia PE42 em relação ao dia E17. Dentro da linhagem de corte, a expressão mais baixa foi observada aos 9 dias do estágio embrionário, seguida pelo maior nível de expressão aos 17 dias. A expressão no dia 1 e 42 pós-eclosão não diferiram das demais idades,

enquanto que o nível de expressão aos 21 dias pós-eclosão e E9 foi o mesmo (Tabela 6 e Figura 10). A expressão de MRF4 dentro da linhagem de corte aumentou  $1,6 \pm 1,20$  vezes no dia E17 em relação ao dia E9.

MRF4 funciona como um regulador positivo da transcrição e está envolvido na maturação dos miotubos durante a diferenciação terminal (FERRI et al., 2009). Segundo Zhang et al. (1995) a localização de Miogenina e MRF4 nos miotubos parece mudar reciprocamente, sugerindo que Miogenina e MRF4 regulam um subconjunto distinto de genes alvos envolvidos na formação e maturação dos miotubos. Diversos resultados confirmam a inibição de Miogenina por MRF4 (FERRI et al., 2009; ZHANG et al., 1995), pois quando há aumento da expressão de MRF4 ocorre um declínio de Miogenina. Essa regulação pode ser observada no presente estudo, pois foi observado que na linhagem de postura, o RNAm de Miogenina foi mais expresso aos 9 e 17 dias embrionários, enquanto que o RNAm de MRF4 foi menos expresso nessas idades (Tabela 6 e Figura 10). Já no período pós-eclosão observamos que houve um declínio na expressão de Miogenina e um aumento da expressão de MRF4, apresentando o pico de expressão aos 42 dias pós-eclosão.

Diferenças significativas foram observadas durante a ontogenia de Miogenina. Na linhagem de postura a expressão deste gene foi maior aos 9 e 17 dias da idade embrionária, seguida por uma redução nos dias 1 e 21 pós-eclosão e aumentando a expressão aos 42 dias pós-eclosão, apresentando expressão igual aos 17 dias da idade embrionária. O declínio da expressão do dia PE21 em relação ao dia E9 foi de  $17,1 \pm 1,20$  vezes. Na linhagem de corte pode-se observar maior expressão nos estádios embrionários 9 e 17, enquanto que no dia 1 pós-eclosão houve um declínio da expressão o qual manteve-se até os 42 dias pós-eclosão (Tabela 6 e Figura 10). A expressão de Miogenina reduziu  $19,7 \pm 1,20$  vezes no dia PE1 em relação ao dia E9.

De modo geral, a Miogenina foi mais expressa durante as idades embrionárias e com um declínio nas idades pós-eclosão nas duas linhagens estudadas. Segundo Andres; Walsh (1996) a expressão de Miogenina antecede a saída do ciclo celular, levando a formação da fibra muscular. Ferri et al. (2009) verificaram um aumento significativo no nível de RNAm de Miogenina após a indução da diferenciação, atingindo o nível máximo de expressão no período intermediário da diferenciação (3 a 5 dias após indução da diferenciação). A análise de *Western blotting* revelou, da mesma maneira, um aumento da proteína Miogenina logo após a indução da diferenciação seguida pelo decréscimo do meio para o final do período de diferenciação.



Na linhagem de postura observou-se um elevado nível de expressão do RNAm de Pax7 nas idades 9 e 17 embrionárias, baixando o nível gradativamente nos dias 1 e 21 e aos 42 dias pós-eclosão houve um aumento da expressão (Tabela 6 e Figura 10). O declínio da expressão do dia PE21 em relação ao dia E9 foi de  $9,8 \pm 1,16$  vezes. Na análise de ontogenia de Pax7 dentro da linhagem de corte, observou-se o maior nível de expressão nas idades 9 e 17 dias embrionárias, baixando o nível gradativamente nos dia 1, 21 e 42 pós-eclosão. Foi observado um declínio de  $8,6 \pm 1,16$  vezes do dia E9 ao dia PE21.

No presente estudo verificou-se a que Pax7 e Miogenina foram expressos simultaneamente na linhagem de corte nas idades embrionárias 9 e 17, e no dia 1 pós-eclosão. Já nas idades 21 e 42 pós-eclosão houve um declínio na expressão de Pax7 enquanto que o nível de Miogenina manteve-se alto. Na linhagem de postura Pax7 e Miogenina foram expressos simultaneamente nos dias 9 e 17 embrionários e aos 21 e 42 dias pós-eclosão. Enquanto que no dia 1 pós-eclosão houve um declínio na expressão de Pax7 e o nível de Miogenina manteve-se alto.

Shin et al. (2009) estudaram diferentes linhagens de corte e postura e verificaram o mesmo nível de expressão de RNAm de Pax7 nos estádios embrionários (E13 e E17) de desenvolvimento do músculo de ambas as linhagens, e após a eclosão o nível de Pax7 também diminuiu em ambas as linhagens. Pax7 é necessário para a especificação das células satélites. Apresenta alta expressão durante a proliferação dos mioblastos com queda durante a diferenciação (SEALE et al., 2000; HALEVY et al., 2004) e é muito utilizado como um marcador inicial da proliferação das células satélites.

A expressão simultânea de Pax7 e Miogenina representa uma população transitória de células frente ao início da diferenciação, mas com o progresso da diferenciação. Porém com o aumento dos níveis de Miogenina, há um declínio nos níveis de Pax7 (HALEVY et al., 2004, DAY et al., 2009; OLGUIN et al., 2007). Segundo Olguin et al. (2007), existe uma interação inibitória cruzada entre Pax7 e os membros da família dos fatores regulatórios miogênicos. Essa interação pode representar um mecanismo adicional para o controle do destino das células satélites, resultando em proliferação, diferenciação e auto-renovação, processos necessários para a manutenção e reparação do músculo esquelético (OLGUIN et al., 2007). Células que co-expressam Pax7 e Miogenina podem manter sua capacidade de proliferação em condições

adequadas, enquanto que células expressando baixos níveis de Pax7 e altos níveis de Miogenina podem ter sofrido diferenciação terminal (HALEVY et al., 2004).

A queda da expressão de Pax7 em relação à Miogenina nos dias 21 e 42 pós-eclosão sugere que uma parte considerável dos mioblastos das galinhas da linhagem de corte tenham sido submetidos à diferenciação. Já na linhagem de postura foi possível visualizar esse processo no dia 1 pós-eclosão. Esses resultados demonstram que o processo de diferenciação ocorre em fases distintas do desenvolvimento da linhagem de corte e de postura.

Embora, normalmente, Pax7 seja regulado negativamente durante a diferenciação miogênica, sua expressão permanente não impede os mioblastos de expressarem Miogenina e nem a fusão em miotubos multinucleados. No entanto, a regulação negativa de Pax7 é necessária para que aconteça a diferenciação terminal (ZAMMIT et al., 2006). Na musculatura esquelética, o declínio na expressão de Pax7, juntamente com o início da expressão de Miogenina, marca a entrada dos mioblastos na fase de diferenciação (YABLONKA-REUVENI et al., 2008; SHEFER et al., 2006). Essa etapa do compromisso com a diferenciação é rapidamente seguida pela saída do ciclo celular, subsequente expressão de proteínas estruturais musculares, e pela fusão em miotubos (HALEVY et al., 2004).

#### **4.4.2 Expressão dos Fatores Miogênicos, Pax7 e Miostatina entre as Linhagens**

No presente estudo não houve diferença significativa na expressão do gene Miostatina entre as linhagens de corte e postura, confirmando resultados obtidos anteriormente por Mott; Ivarie (2002), Scheuermann et al.,(2004) e Guernec et al., (2003). Também não houve diferença significativa na expressão de MyoD entre as linhagens de corte e de postura (Tabela 6).

O RNAm do gene Myf5 foi  $2,0 \pm 1,20$  vezes mais expresso na linhagem de corte em relação a de postura aos 21 ( $p < 0.05$ ) dias após a eclosão (Tabela 6 e Figura 10). Myf5 é conhecido como um fator primário dentre os fatores regulatórios da miogênese. É expresso na maioria das células satélites quiescentes (BEAUCHAMP, et al., 2000), e também em células satélites ativadas, ou seja, entrando no ciclo celular, resultando na determinação de células musculares (DAY et al., 2009; SEALE; RUDNICKI 2000).

A queda na expressão de Myf5 na célula pode ser, possivelmente, em função do início do processo de diferenciação. Por outro lado, em células que mantêm altos níveis de Myf5, este, pode agir impedindo a continuação dos mioblastos no ciclo celular, assim direcionando-os

para reserva, quiescência e auto-renovação (DAY et al., 2009; SEALE; RUDNICKI, 2000). De acordo com Day et al. (2009) e Seale; Rudnicki (2000) pode-se inferir que a maior expressão de Myf5 observada na linhagem de corte possa direcionar a saída dos mioblastos do ciclo celular e para estes serem reservados e utilizados durante o crescimento muscular.

A expressão do RNAm do gene MRF4 foi  $3,2 \pm 1,21$  maior aos 17 ( $p < 0,05$ ) dias da idade embrionária na linhagem de corte em relação a linhagem de postura, já aos 21 dias após a eclosão foi  $1,7 \pm 1,21$  mais expresso ( $p < 0,05$ ) na linhagem de postura em relação a linhagem de corte (Tabela 6 e Figura 10). Os mioblastos em processo de proliferação retiram-se do ciclo celular para iniciar sua diferenciação terminal em miotubos. Essa etapa é marcada pela expressão de MRF4, que age como um fator de diferenciação envolvido na maturação final dos miotubos (BERKES; TAPSCOTT, 2005; CHARGE; RUDNICKI, 2004).

Em estudo de microscopia eletrônica, nas mesmas aves utilizadas no presente estudo, foi possível visualizar os miotubos em formação, tanto na linhagem de corte como na de postura nos embriões do estágio 17, Patricio (Comunicação pessoal).

No presente estudo observou-se alta expressão de MRF4 aos 17 dias do estágio embrionário na linhagem de corte. Tendo em vista que nessa idade os miotubos estão sendo formados, pode-se sugerir que há um número maior de mioblastos em processo terminal de diferenciação em direção a formação da fibra muscular na linhagem de corte em relação à de postura. Já aos 21 dias pós-eclosão, esse processo é mais evidente na linhagem de postura.

A expressão do RNAm de Miogenina foi  $5,7 \pm 1,21$  maior na linhagem de postura em relação à de corte aos 42 ( $p < 0,05$ ) dias pós-eclosão. Não foram observadas diferenças de expressão do RNAm do gene Miogenina entre as linhagens nas idades embrionárias (Tabela 6 e Figura 10). Da mesma maneira os autores Li; Velleman et al. (2009) não encontraram diferenças na expressão de Miogenina no período embrionário quando compararam uma linhagem de galinhas de baixo peso corporal e massa muscular com uma linhagem controle. No entanto, no dia 1 pós-eclosão o RNAm de Miogenina foi mais expresso na linhagem de baixo peso corporal e massa muscular em relação à linhagem controle.

No presente estudo, o RNAm do gene Pax7 apresentou diferença de expressão somente após a eclosão, onde, foi  $1,6 \pm 1,16$  mais expresso na linhagem de corte em relação a de postura no dia 1 ( $p < 0,05$ ), e  $2,3 \pm 1,16$  mais expresso na linhagem de postura em relação a de corte no dia 42 ( $p < 0,05$ ) pós-eclosão (Tabela 6 e Figura 10).

A quantificação do RNAm de Pax7 em linhagens de aves (*Gallus gallus*) de corte e postura foi realizada por Shin et al., (2009). Não houve diferença significativa entre as linhagens nos estádios embrionários (E13 e E17) e em dois (11PE e 33PE) dos quatro estádios pós-eclosão estudados. No dia 1 após a eclosão (1PE) foi observado maior expressão de Pax7 na linhagem de corte em relação à linhagem de postura. No entanto, cinco dias após a eclosão (5PE), o nível de expressão de Pax7 foi maior na linhagem de postura em relação à linhagem de corte.

No presente estudo, foi demonstrado que no dia 1 após a eclosão o RNAm de Pax7 foi mais expresso na linhagem de corte, podendo ser indicativo de que as aves da linhagem de corte têm uma população maior de células satélites proliferando, enquanto que na linhagem de postura está ocorrendo maior diferenciação celular.

Pax7 e Miogenina foram expressos simultaneamente aos 42 dias pós-eclosão. Verificou-se um nível maior de expressão de ambos os genes na linhagem de postura em relação à de corte. A expressão simultânea desses genes aos 42 dias após a eclosão pode sugerir que ambas as linhagens apresentam células satélites proliferando, no entanto, prestes a sofrerem diferenciação, visto que a expressão de Pax7 e Miogenina ao mesmo tempo representa uma população transitória de células frente ao início da diferenciação (HALEVY et al., 2004, DAY et al., 2009; OLGUIN et al., 2007).

#### **4.5 Expressão Relativa da Via de Ação Shh**

Os resultados da análise de variância da expressão gênica com os genes Shh, Ptch1, Smo, PKA, Sufu, Gli2 e Gli3 são apresentados na Tabela 7. O efeito de idade foi significativo para Smo, PKA, Gli2, Gli3 e Sufu, já o efeito de linhagem foi significativo somente para o gene Gli2. A interação idade e linhagem foi significativa para os genes Shh e Ptch1 indicando dependência entre esses efeitos.

Tabela 7 – Probabilidades obtidas na análise de variância para os genes Shh, Ptch1, Smo, PKA, Sufu, Gli2 e Gli3

Gene	n	Idade	Linhagem	Idade x Linhagem
Shh	9	<0,0001	0,0621	0,0418
Ptch1	9	<0,0001	0,0693	0,0095
Smo	9	<0,0001	0,8344	0,7463
PKA	9	<0,0001	0,1606	0,8738
Sufu	9	<0,0001	0,3283	0,6816
Gli2	9	<0,0001	<0,0001	0,3558
Gli3	9	<0,0001	0,1059	0,8374

#### 4.5.1 Ontogenia da expressão da Via de Ação Shh

Durante muito tempo, a via de ação Shh foi considerada silenciosa no desenvolvimento muscular pós-natal (STRAFACE et al., 2008). No presente estudo, foi demonstrado que a sinalização de Shh está ativa na musculatura peitoral de galinhas no final do desenvolvimento embrionário e após a eclosão. O mecanismo intracelular que faz a mediação entre Shh e suas células alvo não é totalmente entendido, no entanto tem sido amplamente pesquisado. O sinal de Hh é transmitido através de dois receptores, as proteínas de membrana Ptch1 e Smo. Na ausência do ligante Shh, Ptch1 está acoplada a Smo inibindo sua atividade, desta maneira as proteínas intactas (*full-length*) Gli2 e Gli3 são proteoliticamente processadas por PKA em formas ativadoras ou repressoras (PAN et al., 2006).

Quando o ligante Shh está presente, como é o caso nesse estudo, o Shh liga-se ao seu receptor Ptch1 que libera Smo, responsável pela transdução do sinal. Uma vez que Smo é liberada, esta inibe o processamento proteolítico de Gli2 e Gli3 e permite que a proteína intacta ative os seus genes alvos, Gli1, Ptch1 e Wnt (VARJOSALO; TAIPALE, 2008).

No presente estudo os genes Shh e Ptch1 apresentaram interação significativa entre idade e linhagem. Primeiramente será discutida a ontogenia da expressão desses genes. Na Tabela 8 são apresentados os resultados da expressão dos genes Shh e Ptch1 nos estádios de desenvolvimento embrionário e pós-eclosão dentro das linhagens de postura (CC) e de corte (TT).

Tabela 8 – Expressão relativa e erro padrão dos genes Shh, Ptch1, Smo, Pka, Sufu, Gli2 e Gli3

Gene	Linhagem	Idade				
		E9d	E17d	PE1d	PE21d	PE42d
Shh	CC	28,4(0,39)aA	33,5(0,39)bA	35,8(0,41)cB	35,7(0,39)cA	35,4(0,39)cA
	TT	28,7(0,39)aA	34,1(0,39)bA	34,3(0,41)bA	34,8(0,39)bA	34,5(0,39)bA
Ptch1	CC	27,1(0,31)aA	28,8(0,32)bA	30,9(0,32)cA	31,3(0,31)cA	30,4(0,31)cA
	TT	27,3(0,32)aA	28,9(0,31)bA	30,5(0,32)cA	31,4(0,31)cdA	32,2(0,31)dB
Smo		23,8(0,19)a	25,7(0,19)b	28,0(0,20)c	28,9(0,19)d	29,6(0,19)e
PKA		20,6(0,13)a	21,3(0,13)b	22,7(0,14)c	23,0(0,13)c	23,9(0,13)d
Sufu		24,3(0,16)a	24,7(0,16)a	27,1(0,17)b	26,9(0,16)b	27,2(0,16)b
Gli2		24,2(0,22)a	24,1(0,22)a	25,8(0,23)b	25,8(0,22)b	25,6(0,23)b
Gli3		25,8(0,20)a	26,9(0,20)b	29,3(0,21)c	30,9(0,20)d	31,5(0,20)d

CC – Linhagem de corte, TT – Linhagem de postura, E9d - 9 dias embrionário, E17d - 17 dias embrionário, PE1d - 1 dia pós-eclosão, PE21d - 21 dias pós-eclosão, PE42d - 42 dias pós-eclosão. Cq – quantitative cycle. Valores seguidos de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna dentro de gene não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ )

Durante a ontogenia, o nível de RNAm de Shh dentro da linhagem de postura foi mais expresso aos 9 dias da fase embrionária, havendo um declínio na expressão aos 17 dias do estágio embrionário até o dia 1 pós-eclosão, no entanto mantendo o mesmo nível de expressão do 1 até os 42 dias após a eclosão (Tabela 8 e Figura 11). Foi observado um declínio de  $128,0 \pm 1,31$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão. Dentro da linhagem de corte, o maior nível de expressão do RNAm de Shh ocorreu aos 9 dias do estágio embrionário, com um declínio na expressão aos 17 dias embrionário, que manteve-se nas idades 1, 21 e 42 pós-eclosão (Tabela 8 e Figura 11). Na linhagem de corte foi observado um declínio de  $55,7 \pm 1,31$  vezes do estágio 9 embrionário em relação aos 42 dias após a eclosão.

A análise da ontogenia demonstrou que na linhagem de postura o RNAm de Ptch1 foi mais expresso aos 9 dias da fase embrionária, seguido pela queda da expressão até o dia 1 pós-eclosão e mantendo este nível nos dias 21 e 42 pós-eclosão (Tabela 8 e Figura 11). Foi observado um declínio de  $9,8 \pm 1,24$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão. Na linhagem de corte o RNAm de Ptch1 foi mais expresso aos 9 dias, havendo um declínio da

expressão até os 42 dias pós-eclosão (Tabela 8 e Figura 11). Foi observado um declínio de  $29,9 \pm 1,24$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão.

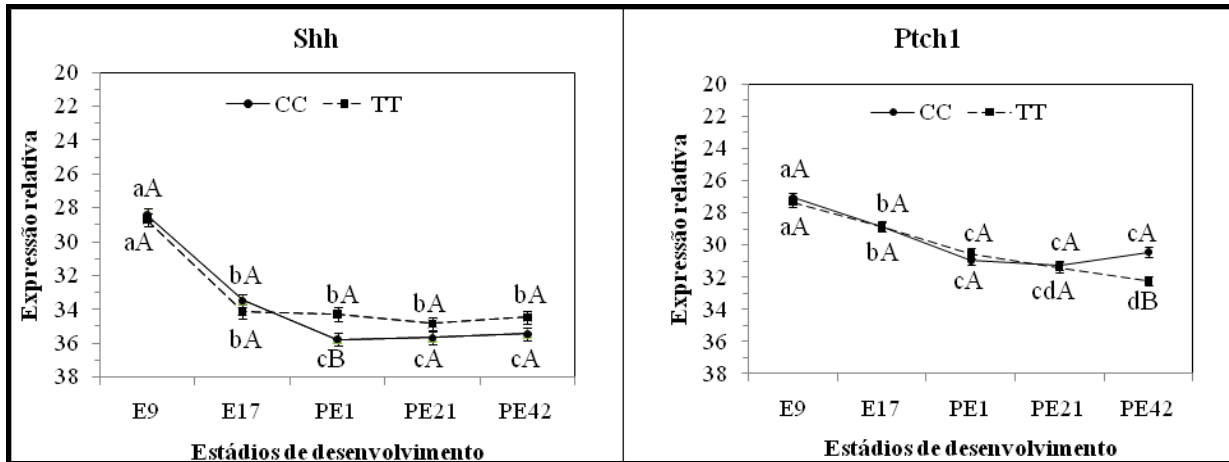


Figura 11 - Expressão relativa dos genes Shh, Ptch1. CC – Linhagem de postura, TT – Linhagem de corte, E9 - 9 dias embrionário, E17 - 17 dias embrionário, PE1 - 1 dia pós-eclosão, PE21 - 21 dias pós-eclosão, PE42 - 42 dias pós-eclosão. Valor baixo da expressão relativa significa maior expressão gênica. Valores seguidos de mesma letra minúscula nos estádios de desenvolvimento e letras maiúsculas entre as linhagens, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

De maneira geral, o RNAm dos genes Shh e Ptch1 foi mais expresso nas idades embrionárias e diminuiu a sua expressão nas idades posteriores a eclosão. O RNAm de Shh e Ptch1 possui o mesmo padrão de expressão dentro da linhagem de postura, embora com diferentes níveis de expressão, onde foi observada alta expressão aos 9 dias, havendo um declínio da expressão até o dia 1 e mantendo o nível até os 42 dias após a eclosão (Tabela 8).

Observando a expressão do RNAm de Shh e Ptch1 dentro da linhagem de corte, verifica-se que esses genes são expressos concomitantemente aos 9 e 17 dias do estágio embrionário, nas idades seguintes há uma queda na expressão de Ptch1 enquanto que Shh mantém o nível do estágio 17 embrionário. A alta queda da expressão de Shh em ambas as linhagens, não foi acompanhada pelo receptor Ptch1. A queda menos acentuada de Ptch1 em relação à Shh pode estar relacionada ao fato que Ptch1 é receptor de outros genes da família Hh, tais como *Desert hedgehog* (Dhh) e *Indian hedgehog* (Ihh) que não foram investigados no presente estudo. Além disso, Ptch1 é auto-regulado pela via Hh.

Durante o desenvolvimento da musculatura esquelética (epaxial e hipaxial) Shh funciona como um fator de sobrevivência e proliferação para as células (KRUGER et al., 2001).

A ausência de Shh induz a diferenciação dos mioblastos primários, por sua vez, essa diferenciação precoce esgota o *pool* de mioblastos em proliferação, resultando em menos massa muscular. Por outro lado, o aumento dos níveis de expressão de Shh mantém os mioblastos primários em um estado indiferenciado, permitindo a proliferação celular e consequentemente o aumento na massa muscular em fases posteriores (BREN-MATTISON et al., 2002).

A expressão de Shh estimula a proliferação celular e permite que as células satélites permaneçam se auto-renovando, enquanto que, ao mesmo tempo, inibe a diferenciação (KOLEVA et al., 2005; DUPREZ et al., 1998). Com base nisso, sugere-se que o declínio da expressão de Shh do estágio embrionário em direção aos 42 dias após a eclosão, foi necessário para permitir a entrada dos mioblastos na fase de diferenciação. Tal fase é marcada pela expressão MRF4, o qual verificou-se ser mais expresso nas idades após a eclosão.

A ação de Shh na proliferação celular foi verificada por Koleva et al. (2005) em células que não cessaram a proliferação por 72 horas após exposição a Shh, ao mesmo tempo, Shh causou a inibição da diferenciação de células satélites em miotubos. Com a inibição do efeito de Shh foi possível visualizar a expressão de miogenina, conhecida por ser expressa em células em processo de diferenciação. Adicionalmente, esses autores verificaram que a expressão de Shh impediu a morte celular. Estudos anteriores relatam a expressão simultânea de Shh e seu receptor Ptch1 nas mesmas células (KOLEVA et al., 2005; STRAFACE et al., 2008, ELIA et al., 2007) indicando a existência de um mecanismo de regulação autócrino na musculatura esquelética formada tardiamente, diferente do mecanismo parácrino de regulação que ocorre durante a embriogênese.

Existem poucas pesquisas envolvendo a via Shh nos estádios avaliados neste estudo. Dentro desse contexto, Elia et al. (2007), usando RT-PCR semiquantitativa, avaliaram a expressão do RNAm de Shh e Ptch1 em cultivo de mioblastos da musculatura peitoral de galinhas nos estádios 18 e 21 embrionários e nos dias 1 a 5 após a eclosão. O RNAm de Shh diminuiu no dia próximo a eclosão, estágio 21 embrionário, aumentou a expressão no dia 1 após a eclosão, mantendo esse nível até o dia 4 após a eclosão e caindo novamente no dia 5 pós-eclosão, o mesmo perfil de expressão foi observado no tecido da musculatura peitoral de galinhas. Já Ptch1 apresentou o mesmo perfil de expressão em todos os estádios avaliados nos mioblastos cultivados, nas células indiferenciadas, nos miotubos e na musculatura peitoral.



Na análise da expressão dos genes Smo, PKA, Sufu, Gli2 e Gli3 não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens. Na Tabela 8 são apresentados os resultados da expressão dos genes Smo, PKA, Sufu, Gli2, Gli3 nos estádios de desenvolvimento embrionário e pós-eclosão.

Como foi mencionado anteriormente, na presença do ligante Shh o receptor Smo é ativado. Smo então coordena mudanças nas proteínas Gli resultando na ativação da transcrição dos genes alvos, dentre eles estão Gli1 e Ptch1 (RUIZ i ALTABA et al., 2007). As três proteínas Gli, fatores de transcrição *zinc-finger*, codificam ambas as funções, ativadora e repressora. Em mamíferos, Gli1 é um forte ativador transcricional, Gli2 apresenta ambas as funções, ativador e repressor e Gli3 apresenta principalmente a atividade repressora. As proteínas Gli, quando intactas, possível de serem modificadas, codificam uma função ativadora, enquanto que a atividade repressora é encontrada principalmente na porção C-terminal de Gli2 e Gli3 quando processadas proteoliticamente (RUIZ i ALTABA, 1999; RUIZ i ALTABA et al., 2007).

Para a sinalização correta da via Shh é necessária a ação de PKA e Sufu, conhecidos como reguladores negativos da sinalização Hh. A PKA tem sido atribuída função na regulação do processamento da proteína Gli3 intacta, a forma repressora (Gli3R) (TIECKE et al., 2007) e Sufu age regulando a entrada de Gli no núcleo celular (BARNFIELD et al., 2005). Sugere-se que a ativação de Smo inibe a função de Sufu (RUIZ i ALTABA et al., 2007).

Embora as atividades transcricionais de Gli sejam inibidas por Sufu e PKA, esse processo é indispensável para a sinalização correta de Hh. Gli2 é processado com perfil ativador (GliA) enquanto que Gli3 é processado com perfil repressor (GliR). Em todas as espécies nas quais a sinalização de Hh já foi estudada, a ativação da sinalização de Hh inibe o processamento proteolítico das proteínas citoplasmáticas Gli e leva a produção das formas do ativador transcricional (GliA). O balanço entre as formas ativadora e repressora das proteínas Gli é de grande importância na resposta celular a sinalização de Hh e ocorre através da combinação da inibição da repressão e ativação destas (RUIZ i ALTABA et al. 2007).

Uma vez que Gli3 forma repressora é gerada, é liberada de Sufu e entra no núcleo da célula para reprimir genes alvos (HUMKE et al., 2010). Esses autores relatam que a interação entre Gli3 e Sufu regula a formação de uma forma repressora ou ativadora de Gli3. Na ausência do sinal de Hh, Sufu restringe Gli3 ao citoplasma promovendo seu processamento em uma forma

repressora (Gli3R). Quando há sinal de Hh, Gli3 dissocia-se de Sufu, impedindo a formação de Gli3R, e permite que Gli3 entre no núcleo, onde é convertida em um ativador transcricional.

Está claro que o controle da expressão da via de ação de Shh deve ser precisamente regulado para que haja um correto desenvolvimento e funcionamento da musculatura. No presente estudo verificou-se que a expressão do RNAm de Smo foi maior aos 9 dias da idade embrionária, diminuindo gradativamente até os 42 dias pós-eclosão (Tabela 8 e Figura 12). Foi observado um declínio de  $55,7 \pm 1,14$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão. O RNAm de PKA foi mais expresso aos 9 dias da idade embrionária, seguido pela redução da expressão até os 42 dias pós-eclosão (Tabela 8 e Figura 12). A redução da expressão foi de  $9,8 \pm 1,10$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão.

O RNAm do gene Sufu foi mais expresso aos 9 e 17 dias da idade embrionária, seguido pela redução da expressão no dia 1 pós-eclosão e mantendo esse nível de expressão até os 42 dias pós-eclosão (Tabela 8 e Figura 12). Observou-se um declínio de  $7,5 \pm 1,10$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão. O RNAm do gene Gli2 foi mais expresso aos 9 e 17 dias da idade embrionária, seguido pela redução da expressão no dia 1 pós-eclosão e mantendo este nível de expressão até os 42 dias pós-eclosão (Tabela 8). O declínio observado do dia 9 em relação ao dia 42 foi de  $2,8 \pm 1,16$  vezes.

O gene Gli3 foi mais expresso aos 9 ( $p < 0,01$ ) dias embrionário, seguido por uma redução gradativa até os 21 dias e mantendo esse nível aos 42 dias pós eclosão (Tabela 8 e Figura 12). Foi observado um declínio de  $52,0 \pm 1,15$  vezes do estágio 9 embrionário aos 42 dias após a eclosão.

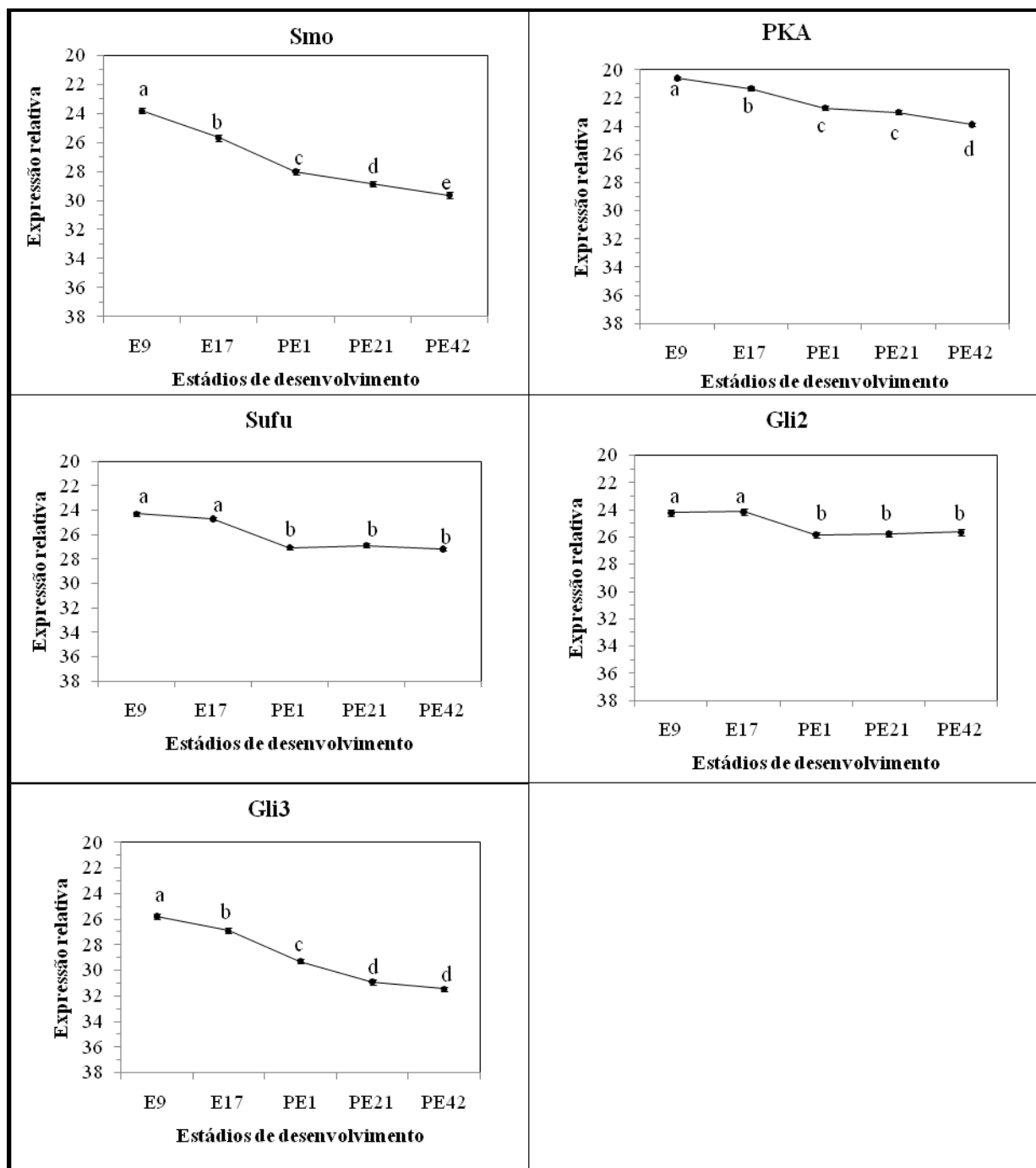


Figura 12 - Expressão relativa dos genes Smo, PKA, Sufu, Gli2 e Gli3. CC – Linhagem de postura, TT – Linhagem de corte, E9 - 9 dias embrionário, E17 - 17 dias embrionário, PE1 - 1 dia pós-eclosão, PE21 - 21 dias pós-eclosão, PE42 - 42 dias pós-eclosão. Valor baixo da expressão relativa significa maior expressão gênica. Valores seguidos de mesma letra minúscula nos estádios de desenvolvimento e letras maiúsculas entre as linhagens, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

De maneira geral, o RNAm dos genes Smo, PKA e Gli3 foi mais expresso nas idades embrionárias e diminuiu gradativamente nas idades seguintes a eclosão, apresentando um padrão de expressão semelhante, embora com diferentes níveis de expressão. Segundo HUMKE et al. (2010), na presença de Shh, Gli3 é liberada de Sufu e então é processada na forma ativadora, podendo ativar os genes alvos.

Foi verificado que Sufu e Gli2 apresentaram o mesmo perfil de expressão, no qual o RNAm foi mais expresso aos 9 e 17 dias embrionários e com queda de expressão após a eclosão, mantendo o mesmo nível de expressão em todas as idades estudadas após a eclosão. Segundo Barnfield et al. (2005) Gli2 é regulado por Sufu, geralmente este é seqüestrado por Sufu, assim impedindo a importação de Gli2 ao núcleo da célula.

Wang et al. (2010) quantificaram o RNAm de Gli1, Gli2 e Gli3 em fibroblastos embrionários de ratos Sufu negativos usando RT-PCR semi quantitativa. Esses autores compararam o nível de RNAm dos genes em células mutantes Sufu negativas e em células selvagens. Foi verificado que a expressão de Gli1 aumentou nas células Sufu negativas, a expressão de Gli2 não foi alterada, enquanto que os níveis da expressão de Gli3 reduziram. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, pois enquanto foi verificada uma leve queda da expressão de Sufu, a expressão de Gli3 foi mais brusca (Tabela 8). Por outro lado, foi verificado que o nível de expressão de Gli2 acompanhou a queda da expressão de Sufu. Renault et al. (2008), estudaram a expressão de Gli2 e Gli3 na resposta a injúria após a indução de isquemia em ratos. Os autores verificaram que o RNAm de Gli2 e Gli3 foi superexpresso no tecido isquêmico e sua expressão foi associada a proliferação e sobrevivência dos mioblastos.

#### **4.5.2 Expressão da Via de Ação Shh entre as linhagens**

Não houve diferença significativa na expressão dos genes Smo, PKA, Sufu, Gli2 e Gli3 entre as linhagens de corte e postura (Tabela 8).

O RNAm de Shh não apresentou diferença de expressão nas idades embrionárias, no entanto foi verificada diferença de expressão entre as linhagens após a eclosão, onde o RNAm do gene Shh foi  $2,8 \pm 1,31$  vezes mais expresso na linhagem de corte em relação à de postura no dia 1 ( $p < 0.05$ ) após a eclosão (Tabela 8 e Figura 11).

No presente estudo foi demonstrado que no dia 1 após a eclosão o RNAm de Pax7 também foi mais expresso na linhagem de corte. Dessa maneira, a maior expressão do RNAm de Pax7 e Shh logo após a eclosão na linhagem de corte em relação a de postura pode indicar que as aves da linhagem de corte têm uma população maior de células satélites proliferando, enquanto que na linhagem de postura está ocorrendo maior diferenciação celular.

Não foi observada diferença significativa entre as linhagens para o gene Ptch1 durante os estádios embrionários avaliados. Após a eclosão o RNAm de Ptch1 foi  $3,5 \pm 1,24$  vezes mais expresso na linhagem de postura em relação a de corte somente aos 42 ( $P < 0.05$ ) dias (Tabela 8 e Figura 12). Da mesma maneira, foi verificado que Pax7 e Miogenina foram mais expressos na linhagem de postura aos 42 dias pós-eclosão. Observados em conjunto, esses dados sugerem que nesta idade a linhagem de corte apresenta mais células em proliferação, o que resultará na hipertrofia muscular.

## 5 CONCLUSÃO

- Os genes Myf5, Miogenina, MRF4, Pax7, Shh e Ptch1 foram diferencialmente expressos durante os estádios de desenvolvimento e entre as linhagens.
- Os genes MyoD, Miostatina, Smo, Pka, Sufu, Gli2 e Gli3 foram diferencialmente expressos somente durante os estádios de desenvolvimento.
- Os genes MyoD, Myf5 e Pax7 foram mais expressos na fase embrionária, onde há maior proliferação celular. Os genes da Miogenina e MRF4, os quais atuam no processo de diferenciação celular, apresentaram uma auto-regulação entre eles durante os estádios de desenvolvimento, indicando constante crescimento muscular. O gene da Miostatina demonstrou estar inibindo o crescimento muscular nos dias que antecedem a eclosão.
- Os genes da via de ação Shh foram mais expressos nas idades embrionárias, onde esta via age como um fator de sobrevivência e proliferação celular, e menos expressos nas idades posteriores a eclosão, provavelmente, para que haja o processo de diferenciação dos mioblastos.
- Verificou-se que os genes foram diferencialmente expressos sendo coordenados espaço-temporalmente, permitindo assim um ajuste sutil entre proliferação e diferenciação das células musculares, colaborando para as diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens.



## REFERÊNCIAS

ALLEN, R.E.; MERKEL, R.A.; YOUNG, R.B. Cellular aspects of muscle growth: myogenic cell proliferation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, p.115-127, 1979.

ALVARES, L.E. **Quantificação da expressão dos fatores miogênicos e de Pax-3 durante o desenvolvimento embrionário de aves**. 2001. 132p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2001.

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

AMTHOR, H.; HUANG, R.; MCKINNELL, I.; CHRIST, B.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; PATEL, K. The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. **Developmental biology**, New York, v. 251, n. 2, p. 241-257, 2002.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 5245–5250, 2004.

ANDREOTE, A.P.D. **Identificação de microRNAs na musculatura esquelética de Gallus gallus**. 2008. 88p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ANDRES, V.; WALSH, K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 132, p. 657-666, 1996.

BARNFIELD, P.C.; ZHANG, X.; THANABALASINGHAM, V.; YOSHIDA, M.; HUI, C.C. Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. **Differentiation**, London, v. 73, n. 8, p. 397-405, 2005.



BEAUCHAMP, J.R.; HESLOP, L.; YU, D.S.; TAJBAKSHI, S.; KELLY, R.G.; WERNIG, A.; BUCKINGHAM, M.E.; PARTRIDGE, T.A.; ZAMMIT, P.S. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. **The Journal of cell biology**, New York, v. 151, n. 6, p. 1221-1234, 2000.

BERKES, C.A.; TAPSCOTT, S.J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 16, p. 585-595, 2005.

BERRI, C.; LE BIHAN-DUVAL, E.; DEBUT, M.; SANTÉ-LHOUELLE, V.; BAÉZA, E.; GIGAUD, V.; JÉGO, Y.; DUCLOS, M.J. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85, p. 2005-2011, 2007.

BOSCHIERO, C.; NONES, K.; ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; MOURA, A.S.A.M.T. Mapeamento fino de uma região associada a QTLs no cromossomo 1 da galinha. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7., 2008, São Carlos,. **Resumos...**, São Carlos, 2008. 1 CD-ROM

BOSCHIERO, C.; JORGE, E.C.; NINOV, K.; SILVA, N.A.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; MOURA, A.S.A.M.T. Polimorfismos de base única (SNP) no gene IGF1 na galinha In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2009, Maringá,. **Resumos...** Maringá, 2009. 1 CD-ROM

BREN-MATTISON Y, OLWIN B.B. Sonic hedgehog inhibits the terminal differentiation of limb myoblasts committed to the slow muscle lineage. **Developmental Biology**, New York , v. 242, n. 2, p. 130-148, 2002.

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

BRYSON-RICHARDSON, R.J.; CURRIE, P.D. The genetics of vertebrate myogenesis. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, p. 632-646, 2008.

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

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

BURT D.W.; HOCKING, P. M. Mapping quantitative trait loci and identification of genes that control fatness in poultry. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 61, n. 4, p. 441-446, 2002.

BUSTIN, S.A. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. **Methods**, San Diego, v. 50, p. 217-226, 2009.

BUSTIN, S.A; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, V. 34, p. 597-601. 2005.

CASTELHANO-BARBOSA, E.C.; GABRIEL, J.E.; ALVARES, L.E.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; COUTINHO, L.L. Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development. **Growth, Development, and Aging**, Bar Harbor, v. 69, n. 1, p. 3-12, 2005.

CHARGÉ, S.B.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, Washington, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHEN, J.C.; GOLDHAMER, D.J. Transcriptional mechanisms governing MyoD expression in the mouse. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 296, p. 213-219, 1999.

CHERVONEVA, I.; LI, Y.; SCHULZ, S.; CROKER, S.; WILSON, C.; WALDMAN, S.A.; HYSLOP, T. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**, London, v. 14, n.11, p. 1-15, 2010.

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

CIKOS, S.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, London, v. 20, p. 8-13, 2007.

COLLINS, C.A.; GNOCCHI, V.F.; WHITE, R.B.; BOLDRIN, L.; PEREZ-RUIZ, A.; RELAIX, F.; MORGAN, J.E.; ZAMMIT, P.S. Integrated Functions of Pax3 and Pax7 in the Regulation of Proliferation, Cell Size and Myogenic Differentiation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, p. 1-13, 2009.

COOPER, R.N.; TAJBAKHSI, S.; MOULY, V.; COSSU, G.; BUCKINGHAM, M.; BUTLER-BROWNE, G.S. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. **Journal of Cell Science**, London, v. 112, n.17, p. 2895-2901, 1999.

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

DAY, K.; PATERSON, B.; YABLONKA-REUVENI, Z. A distinct profile of myogenic regulatory factor detection within Pax7+ cells at S phase supports a unique role of Myf5 during posthatch chicken myogenesis. **Developmental Dynamics**, New York, v. 238, n. 4, p.1001-1009, 2009.

De KOK, J.B.; ROELOFS, R.W.; GIESENDORF, B.A.; PENNING, J.L.; WAAS, E.T.; FEUTH, T.; SWINKELS, D.W.; SPAN, P.N. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. **Laboratory Investigation**, New York, v. 85, p. 154–159, 2005.

DOHERTY, M.K.; MCLEAN, L.; HAYTER, J.R.; PRATT, J.M.; ROBERTSON, D.H.; EL-SHAFEI, A.; GASKELL, S.J.; BEYNON, R.J. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 2082-2093, 2004.

DUPREZ, D.; FOURNIER-THIBAUT, C.; LE DOUARIN, N. Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 495–505, 1998.

ELIA, D.; MADHALA, D.; ARDON, E.; RESHEF, R.; HALEVY, O. Sonic hedgehog promotes proliferation and differentiation of adult muscle cells: Involvement of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1773, p. 1438-1446, 2007.

HUMKE, E.W.; DORN, K.V.; MILENKOVIC, L.; SCOTT, M.P.; ROHATGI, R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. **Genes & Development**, New York, v. 24, n. 7, p. 670-682, 2010.

FERRI, P.; BARBIERI, E.; BURATTINI, S.; GUESCINI, M.; D'EMILIO, A.; BIAGIOTTI, L.; DEL GRANDE, P.; DE LUCA, A.; STOCCHI, V.; FALCIERI, E. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 108, p. 1302-1317, 2009.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C.; AVILA, V.S.; BRUM, P.A.R.; FIORENTIN, L.; JAENISCH, F.R.F. Genetic gain in egg production and egg weight in White Leghorn Embrapa 011. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOC. LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2003. Porto Alegre **Proceedings...**Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS, 2003b. 1 CD-ROM.

FIGUEIREDO, E.A.P.; ROSA, P.S.; SCHEUERMANN, G.N.; JAENISCH, F.R.F.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.; BRENTANO, L.; COSTA, C.A.F. Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOC. LATINO AMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18.,2003. Porto Alegre. **Proceedings...**Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS, 2003a. 1 CD-ROM.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 8. Maringá,. Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 817p.

GROBET, L.; MARTIN, L.J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MÉNISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, London, v. 17, p. 71-74, 1997.

GUERNEC, A.; BERRI, C.; CHEVALIER, B.; WACRENIER-CERE, N.; LE BIHAN-DUVAL, E.; DUCLOS, M.J. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. **Growth Hormone & Igf Research**, London, v. 13, n. 1, p. 8-18, 2003.

GUSTAFSSON, M.K.; PAN, H.; PINNEY, D.F.; LIU, Y.; LEWANDOWSKI, A.; EPSTEIN, D.J.; EMERSON, C.P. Jr. Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. **Genes & Development**, New York, v. 16, n. 1, p.114-126, 2002.

HALEVY, O.; PIESTUN, Y.; M. ALLOUH, M.; ROSSER, B.; RINKEVITCH, Y.; RESHEF, R.; ROZENBOIM, I.; WLEKLINSKI-LEE, M.; YABLONKA-REUVENI, Z. The pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. **Developmental Dynamics**, New York, v. 231, p. 489–502, 2004.

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

HOOPER, J.E.; SCOTT, M.P. Communicating with Hedgehogs. **Nature reviews**, London, v. 6, n. 4, p. 306-317, 2005

INGHAM, P.W.; MCMAHON, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & Development**, New York, v.15, p. 3059–3087, 2001.

INGHAM, P.W.; PLACZEK, M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. **Nature Reviews**, London, v. 7, n. 11, p. 841-850, 2006.

JIA, J.; JIANG, J. Decoding the Hedgehog signal in animal development. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v.63, n. 11, p. 1249-1265, 2006.

JORGE, E.C. **Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*)**. 2006. 150p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

KOLEVA, M.; KAPPLER, R.; VOGLER, M.; HERWIG, A.; FULDA, S.; HAHN, H.; Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 62, p. 1863–1870, 2005.

KRÜGER, M.; MENNERICH, D.; FEES, S.; SCHÄFER, R.; MUNDLOS, S.; BRAUN, T. Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 5, p. 743-752, 2001.

LE GRAND, F.; RUDNICKI, M.A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. **Curr Current Opinion In Cell Biology**, Philadelphia, v. 19, n. 6, p. 628-633, 2007.

LANGLEY, B.; THOMAS, M.; BISHOP, A.; SHARMA, M.; GILMOUR, S.; KAMBADUR, R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 51, p. 49831-49840, 2002.

LEDUR, M.C.; BERTANI, G.R. Análise genômica na avicultura: Resultados e perspectivas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL 4., 2002. Campo Grande. **Anais...**Campo Grande,MS, 2002. p. 132-141.

LEWIS, P.M.; DUNN, M.P.; MCMAHON, J.A.; LOGAN, M.; MARTIN, J.F.; ST-JACQUES, B.; MCMAHON, A.P. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. **Cell**, Cambridge, v. 105, n. 5, p. 599-612, 2001.

LI, L.; LIU, H.H.; XU, F.; SI, J.M.; JIA, J.; WANG, J.W. MyoD expression profile and developmental differences of leg and breast muscle in Peking duck (*Anas platyrhynchos Domestica*) during embryonic to neonatal stages. **Micron**, Oxford, v. 41, p. 847-852, 2010.

LI, X.; VELLEMAN, S.G. Effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on embryonic and posthatch muscle growth and development in normal and low score normal chicken. **Poultry Science**, Menasha, v. 88, p. 265-275, 2009.

LI, X.; BLAGDEN, C.S.; BILDSOE, H.; BONNIN, M.A.; DUPREZ, D.; HUGHES, S.M. Hedgehog can drive terminal differentiation of amniote slow skeletal muscle, **BMC Developmental Biology**, London, v. 6, p. 4-9, 2004.

LI, Y.; ZHANG, H.; LITINGTUNG, Y.; CHIANG, C. Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 17, p. 6548-53, 2006.

LINDON, C.; MONTARRAS, D.; PINSET, C. Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 140, n. 1, p.111-118, 1998.

LIU, H.C.; HICKS, J.A. Using proteomics to understand avian systems biology and infectious disease. **Poultry Science**, Menasha, v. 86, p. 1523-1529, 2007.

LUDOLPH, D.C.; KONIECZNY, S.E. Transcription factors families: muscling in on the myogenic program. **The FASEBJ Journal**, Bethesda, v.9, p.1595-1604, 1995.

MARCHESIN, M.L. **Estudo da determinação e diferenciação da musculatura esquelética em aves**, 2008. 87p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2008.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, Baltimore, v. 9, p. 493-495, 1961.

MCCROSKERY, S.; THOMAS, M.; PLATT, L.; HENNEBRY, A.; NISHIMURA, T.; MCLEAY, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. **Journal of Cell Science**, London, v.118, n. 15, p. 3531-3541, 2005.

MCCURLEY, A.T.; CALLARD, G.V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. **BMC Molecular Biology**, London, v. 12, 99-102, 2008.

MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, London, v. 387, p. 83-90, 1997.

MEIJERINK, J.; MANDIGERS, C.; VAN DE LOCHT, L.; TÖNNISSEN, E.; GOODSID, F.; RAEMAEEKERS, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 3, p. 55-61, 2001.

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

MOTT, I.; IVARIE, R. Expression of myostatin is not altered in lines of poultry exhibiting myofiber hyper- and hypoplasia. **Poultry Science**, Menasha, v. 81, n. 6, p. 799-804, 2002.

NAYA, F.S; OLSON, E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 11, p. 683–688, 1999.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, Monthly, v. 1, p.1559-1582, 2006.

OLGUIN, H.C.; YANG, Z.; TAPSCOTT, S.J.; OLWIN, B.B. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 177, p. 769–779, 2007.

PAN, Y.; BAI, C.B.; JOYNER, A.L.; WANG, B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. **Journal of Molecular Cell Biology**, Cary, v. 26, n. 9, p. 3365-3377, 2006.



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

PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**, London, v. 11, p. 69-79, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, p. 2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W. Relative quantification. in: DORAK, T. (Ed.). **Real-time PCR**. Published by International University Line 2009. p 63-82.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 26, p. 509-515, 2004.

POLA, R.L.E.; LING, T.R.; APRAHAMIAN, B.S.E.; BARBAN, M. Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia, **Circulation**, Dallas, v. 108, p. 479-485, 2003.

POWNALL, M.E.; GUSTAFSSON, M.K.; EMERSON, C.P.JR. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 18, p. 747-783, 2002.

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

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F.; Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, p. 62-66, 2003.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In MEUER, S., WITTER, C.; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid cycle Real time PCR, Methods and applications**. Heidelberg,:Springer Press. 2001. p. 21:34.

RENAULT, M.A.; JEROME, R.; JOERN, T.; HIROMICHI, H.; TINA, T.; SOL, M.; AIKO, I.; TREVOR, C.; MEREDITH, M.; ANDREW, S.; EKATERINA, K.; DOUGLAS, W. L. Gli2 and Gli3 Are Over-expressed in the Ischemic Tissue and Participate in Ischemia-induced Angiogenesis and Myogenesis. **Circulation**, Dallas, v.118, p. 551, 2003.

RUIZ i ALTABA, A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. **Development**, Cambridge, v. 126, n. 14, p. 3205-3216, 1999.

RUIZ i ALTABA, A.; MAS, C.; STECCA, B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 17, n. 9, p. 438-447, 2007.

RUTLEDGE, R.G; STEWART, D. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. **BMC BMC Molecular Biology**, London, v. 30, p. 54-60, 2008.

SCHEUERMANN, G.N.; BILGILI, S.F.; TUZUN, S.; MULVANEY, D.R. Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. **Poultry Science**, Menasha. v. 3, p. 1404-1412, 2004.

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

SEALE, P.; SABOURIN, L.A.; GIRGIS-GABARDO, A.; MANSOURI, A.; GRUSS, P.; RUDNICKI, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, Cambridge, v. 102, p. 777-786, 2000.

SHEFER, G.; VAN DE MARK, D.P.; RICHARDSON, J.B.; YABLONKA-REUVENI, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Developmental Biology**, New York , v. 294, n. 1, p. 50-66, 2006

SHI, X.; GARRY, D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**, New York, v. 20, n. 13, p. 1692-708, 2006.

SHIMOKAWA, T.; TOSTAR, U.; LAUTH, M.; PALANISWAMY, R.; KASPER, M. TOFTGARD R, Z.A.; PHIROPOULOS, P.G. Novel human glioma-associated oncogene 1 (GLI1) splice variants reveal distinct mechanisms in the terminal transduction of the hedgehog signal. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore. v. 283, p. 14345-14354, 2008.

SHIN, J.; VELLEMAN, S.G.; LATSHAW, J.D.; WICK, M.P.; SUH, Y.; LEE, K. The ontogeny of delta-like protein 1 messenger ribonucleic acid expression during muscle development and regeneration: comparison of broiler and Leghorn chickens. **Poultry Science**, Menasha , v. 88, n. 7, p.1427-1437, 2009.

SMITH, J. H. Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken. **Poultry Science**, Menasha, v. 42, p. 283–290, 1963.

SOUZA, C.A; LEDUR, M.C; COUTINHO, L.L. Avaliação do efeito de polimorfismos nos genes da miostatina, myod e miogenina em características quantitativas de desempenho e carcaça em Gallus gallus. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005. Águas de Lindóia. SP. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2005.1 CD-ROM.

STERN, C.D. TheE chick; a great model system becomes even greater. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, p. 9-17, 2005.

STOCKDALE, F.E. Myogenic cell lineages. **Developmental Biology**, New York, v.154, n. 2, p. 284-298, 1992.

STRAFACE, G.; APRAHAMIAN, T.; FLEX, A.; GAETANI, E.; BISCETTI, F.; SMITH, R.C.; PECORINI, G.; POLA, E.; ANGELINI, F.; STIGLIANO, E.; CASTELLOT, J.J.; LOSORDO, D.W.; POLA, R. Sonic Hedgehog Regulates Angiogenesis and Myogenesis During Post-Natal Skeletal Muscle Regeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 13, p. 2424-2435, 2008.

SUNDARESAN, N.R.; SAXENA, V.K.; SINGH, R.; JAIN, P.; SINGH, K.P.; ANISH, D.; SINGH, N.; SAXENA, M.; AHMED, K.A. Expression profile of myostatin mRNA during the embryonic organogenesis of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 85, p. 86-91, 2008.

SZABO, A.; PEROU, C.M.; KARACA, M.; PERREARD, L.; PALAIS, R.; QUACKENBUSH, J.F.; BERNARD, P.S. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. **Genome Biology**, London, v.5, n. 8, p. 49-59, 2004.

TE PAS, M.F.W.; EVERTS, M.E.; HAAGSMAN, H.P. **Muscle development of livestock animals – physiology, genetics and meat quality**. CAB International, 2004. 411p.

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

TIECKE, E.; TURNER, R.; SANZ-EZQUERRO, J.J.; WARNER, A.; TICKLE, C. Manipulations of PKA in chick limb development reveal roles in digit patterning including a positive role in Sonic Hedgehog signaling. **Developmental Biology**, New York, v. 305, n. 1, p. 312-324, 2007.

VANDESOMPELE, J.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M.W. “**Reference gene validation software for improved normalization**” Chapter 4 in **Real-Time PCR: Current Technology and Applications**, Publisher: Caister Academic Press. Editor: Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick, 2009.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 18, p. 3-7, 2002.

VARJOSALO, M.; TAIPALE, J. Hedgehog: functions and mechanisms. **Genes & development**, New York, v. 22, n. 18, p. 2454-2472, 2008.

VELLEMAN, S.G. Muscle development in the embryo and hatchling. **Poultry Science**, Menasha, v. 86, p. 1050-1054, 2007.

WALTERHOUSE, D.O.; YOON, J.W.; IANNACCONE, P.M. Developmental pathways: Sonic hedgehog-Patched-Gli. **Environmental Health Perspectives**, New York, v.107, p.167–171, 1999.

WANG, C.; PAN, Y.; WANG, B. Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors. **Development**, Cambridge, v. 137, p. 2001-2009, 2010.

WANG, X.Q.; ROTHNAGEL, J.A. Post-transcriptional regulation of the gli1 oncogene by the expression of alternative 5' untranslated regions. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p.1311-1316, 2001.

YABLONKA-REUVENI, Z.; DAY, K.; VINE, A.; SHEFER, G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 14, p. 207-216, 2008.

ZAMMIT, P.; BEAUCHAMP, J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? **Differentiation**, London, v. 68, n. 4-5, p. 193-204, 2001.

ZAMMIT, P.S.; RELAIX, F.; NAGATA, Y.; RUIZ, A.P.; COLLINS, C.A.; PARTRIDGE, T.A.; BEAUCHAMP, J.R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**, London, v. 119, p. 1824-1832, 2006.

ZAROS, L.G; COUTINHO, L.L.; SIDER, L.H.; de MEDEIROS, H. R.; das NEVES, M.R.M.; BEVENUTI, C.L.B.; NAVARRO, A.M.do C.; VIEIRA, L.da S. Evaluation of reference genes for real-time PCR studies of Brazilian Somalis sheep infected by gastrointestinal nematodes. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 486-490, 2010.

ZHANG, W.; BEHRINGER, R.R.; OLSON, E.N. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. **Genes & development**, New York, v. 9, n. 11, p.1388-1399, 1995.