

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS  
EXPRESSAS (EST) NA MUSCULATURA PEITORAL DE FRANGOS  
DE CORTE**

**HELENA JAVIEL ALVES**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura  
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de  
concentração: Ciência Animal e Pastagens

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Setembro - 2004

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS  
EXPRESSAS (EST) NA MUSCULATURA PEITORAL DE FRANGOS  
DE CORTE**

**HELENA JAVIEL ALVES**

Médica Veterinária

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

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de  
concentração: Ciência Animal e Pastagens

**P I R A C I C A B A**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Setembro - 2004

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

Alves, Helena Javiel

Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte / Helena Javiel Alves. - - Piracicaba, 2004.  
103 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.  
Bibliografia.

1. Biologia animal 2. Desenvolvimento animal 3. Expressão gênica 4. Frangos de corte 5. Linhagem animal 6. Melhoramento genético animal I. Título

CDD 636.513

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

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, acima de tudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, agradeço pela oportunidade, orientação e pelos valiosos ensinamentos.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Produção Animal pelos ensinamentos adquiridos.

Às secretárias do Departamento de Produção Animal pelo atendimento e atenção recebidos.

Ao funcionário Alexandre do Departamento de Produção Animal, pela ajuda nos experimentos.

Ao Dr. André Vettore, Dra. Otavia Caballero e à Márcia pela ajuda recebida.

À Dra. Cláudia Barros Monteiro Vitorello pela grande ajuda, apoio e amizade.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA-EMBRAPA) pela valiosa colaboração.

À Dra. Mônica Correa Ledur pelo apoio e amizade.

Ao amigo Marcelo de Lima Marchesin pela valiosa ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Às amigas Érika, Clarissa, Rachel e Gisele pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, pelo carinho, incentivo e apoio sempre recebidos.

Ao Junior, pelo apoio, carinho e incentivo em todos os momentos.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia pela amizade e convivência.

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Origem embrionária da musculatura esquelética.....	3
2.2 O programa miogênico.....	6
2.2.1 Regulação positiva da miogênese .....	7
2.2.2 Regulação negativa da miogênese.....	8
2.2.3 Expressão dos MRFs, Pax-3 e miostatina no músculo adulto de aves	9
2.3 A maturação da fibra muscular.....	10
2.3.1 Tipos de fibras musculares.....	13
2.4 Seqüências expressas (EST).....	15
2.5 <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs).....	17
2.6 PCR em tempo real.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Incubação dos ovos e coleta dos tecidos.....	24
3.1.1 Pesagens.....	26
3.1.2 Extração de RNA total.....	27
3.1.3 Isolamento do RNA mensageiro.....	27
3.1.4 Construção das bibliotecas de cDNA.....	28
3.1.4.1 Síntese da primeira fita de cDNA.....	28
3.1.4.2 Síntese da segunda fita de cDNA.....	29

	Página
3.1.4.3 Adição do adaptador Sal I.....	30
3.1.4.4 Digestão com Not I.....	30
3.1.4.5 Fracionamento do cDNA.....	32
3.1.4.6 Ligação ao vetor pSPORT 1.....	32
3.2 Preparação das células competentes e transformação por choque térmico.....	33
3.3 Mini-preparação do DNA plasmidial.....	34
3.4 PCR da mini-preparação.....	35
3.5 Seqüenciamento.....	36
3.6 Purificação da reação de seqüenciamento .....	36
3.7 Análise das seqüências .....	37
3.7.1 Análise de qualidade de seqüências ( <i>Phred</i> ).....	38
3.7.2 Clusterização( <i>Cap3</i> ).....	38
3.7.3 Relatórios.....	39
3.7.4 Blastx.....	39
3.7.5 Categorização das seqüências .....	40
3.8 Análise de expressão gênica.....	41
3.8.1 Incubação dos ovos e coleta dos tecidos.....	42
3.8.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	43
3.8.3 PCR em tempo real.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Parâmetros de peso.....	46
4.2 Extração de RNA total e seleção do RNA mensageiro.....	47
4.3 Construção da biblioteca de cDNA.....	48
4.4 Avaliação de tamanho dos insertos clonados.....	48
4.4.1 Análise das ESTs.....	49
4.4.2 Categorização das ESTs.....	54
4.4.2.1 Análise das sequências <i>No hits</i> .....	55
4.4.2.2 Categoria outras.....	56

	Página
4.4.2.3 Proteínas musculares.....	58
4.5 <i>Gene ontology</i> .....	62
4.6 Análise de polimorfismo.....	66
4.7 Análise das ESTs biblioteca-específicas.....	68
4.8 Análise de expressão gênica.....	70
4.8.1 Extração de RNA total.....	70
4.8.2 PCR em tempo real.....	71
4.8.3 Análise de expressão dos fatores miogênicos: MyoD, MRF4 e miogenina; Pax-3 e miostatina.....	72
5 CONCLUSÕES.....	78
ANEXOS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

# IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS EXPRESSAS (EST) NA MUSCULATURA PEITORAL DE FRANGOS DE CORTE

Autora: HELENA JAVIEL ALVES

Orientador: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

## RESUMO

A produção de aves no Brasil vem crescendo na ordem de 10% a cada ano, o que se explica pela atualização constante da tecnologia do setor (<http://www.abef.com.br>). Sendo a carne de frango a fonte de proteína animal mais barata e acessível ao consumidor, há necessidade de se produzir cada vez mais animais com maior acúmulo de massa muscular. Para isso, o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação da musculatura esquelética é de extrema relevância. Os fatores miogênicos, genes responsáveis pela determinação e diferenciação de células musculares, foram clonados e progressos significativos foram desenvolvidos quanto ao controle da expressão dos mesmos. A utilização da técnica de seqüenciamento de DNA possibilita a identificação e caracterização de novos genes envolvidos na complexa rede de fatores que regulam a formação da musculatura esquelética em aves. Neste estudo, foram construídas duas bibliotecas de cDNA (fase embrionária e pós-eclosão) de músculo peitoral de uma linhagem de corte (TT) e uma biblioteca da fase embrionária de uma linhagem de postura (CC). A análise das seqüências EST (*Expressed Sequence Tags*) foi utilizada



para identificar possíveis novos genes envolvidos no processo de formação da musculatura esquelética. As seqüências EST identificadas possibilitaram a construção de um banco com 6247 ESTs da musculatura peitoral das linhagens de corte e postura nas duas fases de desenvolvimento. Com o intuito de estabelecer uma relação entre o perfil de expressão dos fatores miogênicos: MyoD, MRF4 e miogenina; e dos genes Pax-3 e miostatina e a formação e maturação das fibras musculares, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Em geral, a expressão dos fatores miogênicos foi maior na linhagem de corte em relação à de postura nas idades estudadas. Este estudo deverá contribuir para as áreas celular e molecular de desenvolvimento, além de fornecer recursos úteis aos programas de melhoramento genético de aves que visam obter animais com maior acúmulo de massa muscular.

# IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXPRESSED SEQUENCE TAGS (EST) IN BROILER'S BREAST MUSCLE

Author: HELENA JAVIEL ALVES

Adviser: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

## SUMMARY

Brazilian's chicken production is increasing annually around 10%, which can be explained by the current technology applied to this sector (<http://www.abef.com.br>). Being chicken's meat the cheapest animal protein source for consumers, there is a need to produce even more animals with increased muscular mass. For this purpose, understanding the molecular and cellular mechanisms involved with the skeletal muscle development is of great relevance. The myogenic factors, genes responsible for the determination and differentiation of muscle cells, were cloned and significant progress was made on the control of their expression. The use of DNA sequencing technique allows the identification and characterization of new genes involved in the complex chain of factors signalling systems that regulates the expression of avian skeletal muscles. In this study, two cDNA libraries (embryonic and post-hatching phases) were constructed from the breast muscle of a chicken broiler line (TT) and one library, from the embryonic phase, from a chicken layer line (CC). The EST (Expressed Sequencing Tags) analysis was used to identify probable new genes involved in the skeletal muscle development. The identified ESTs were used to generate a database containing 6247 breast muscle ESTs from two

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

