



ANÁLISE COMPARATIVA DE GENES EXPRESSOS NA HIPÓFISE E HIPOTÁLAMO DE AVES DE CORTE E POSTURA¹

CLARISSA SANCHES DA SILVA², ÉRIKA CRISTINA JORGE³, MATEUS PATRÍCIO⁴, MÔNICA CORRÊA LEDUR⁵, LUIZ LEHMANN COUTINHO⁶

¹ Fapesp e Prodetab

² Doutoranda – Bolsista CAPES – Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP – Piracicaba, SP – Brasil

³ Doutoranda – Bolsista CNPq – Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP – Piracicaba, SP – Brasil

⁴ Estagiário – Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP – Piracicaba, SP – Brasil

⁵ Pesquisadora – Embrapa Suínos e Aves – Concórdia, SC – Brasil

⁶ Professor Associado – Bolsista CNPq – Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP – Piracicaba, SP – Brasil

RESUMO - A hipófise e o hipotálamo controlam diversos processos fisiológicos, incluindo aqueles de interesse econômico. Neste trabalho, foram construídas bibliotecas de cDNA a partir destes tecidos de duas linhagens de aves (corte e postura). ESTs foram seqüenciadas no intuito de identificar genes e polimorfismos capazes de explicar as peculiaridades de cada linhagem. Das seqüências presentes nos 680 *contigs* obtidos, 69,41% apresentaram similaridade com seqüências de outras bibliotecas; 13,82% apresentaram-se biblioteca-específicas e 16,76% linhagem-específicas. Foram identificados SNPs linhagem-específicos em 27 *contigs*, sendo que os presentes em nove destes podem estar relacionados com diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens.

PALAVRAS-CHAVE: EST, Hipófise, Hipotálamo, SNP

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENES EXPRESSED IN THE PITUITARY AND HYPOTHALAMUS OF BROILER AND LAYER CHICKENS

ABSTRACT - The majority of the physiological processes, including those of economic interest, are controlled by the pituitary and hypothalamus. In this study, cDNA libraries of these tissues from two divergent lines of chickens (broiler and layer) were constructed. ESTs were sequenced to identify genes and polymorphisms able to explain the peculiarities of each line. Of the sequences present in 680 *contigs*, 69.41% showed similarity with sequences of other libraries, 13.82% were library-specific and 16.76% line-specific. Line-specific SNPs were identified in 27 *contigs*, those contained in nine of these *contigs* can be related with phenotypic differences observed between the lines.

KEYWORDS: EST, Hypothalamus, Pituitary, SNP

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a avicultura brasileira alcançou altos índices de desempenho na produção de carne e ovos, como resultado da atualização constante de tecnologias no setor. Tais investimentos fizeram com que o Brasil alcançasse a posição de segundo maior produtor e exportador de carne de frango.

Embora grandes esforços tenham sido empregados na seleção de aves, uma das principais limitações do aumento de produção é a incompleta elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos de interesse econômico, como por exemplo, resistência a doenças, formação de tecido muscular e regulação do crescimento e postura.

Sabe-se que praticamente toda a fisiologia do animal é controlada direta ou indiretamente pela hipófise e hipotálamo. Desta forma, a identificação de genes expressos nestas estruturas, além de preencher as lacunas existentes na compreensão das vias moleculares envolvidas, forneceria ferramentas que poderiam ser empregadas em futuros programas de melhoramento animal. Entre as metodologias disponíveis para a identificação de genes, a análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) tem provado ser bastante informativa. Esta consiste na construção de uma biblioteca de cDNA à partir da população de RNA mensageiro (mRNA) presente em um determinado tecido ou tipo celular, com posterior seqüenciamento de uma das extremidades dos insertos obtidos (Adams et al., 1991). Esta abordagem possibilita, também, a inferência do padrão de expressão dos genes com base na freqüência relativa dos mesmos e a identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que podem ser relacionados a fenótipos de interesse.

Como a principal linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP é o estudo das vias moleculares envolvidas no processo de aumento da produção, esta

metodologia vem sendo empregada para análise dos genes expressos em tecidos precursores de musculatura esquelética (somitos e membros) e musculatura peitoral de embriões e aves jovens. Já no presente trabalho, o objetivo foi identificar e analisar o conjunto de genes expressos (ESTs) na hipófise e hipotálamo de duas linhagens de aves divergentes quanto ao potencial de crescimento: uma linha macho de corte (TT) e uma linhagem de postura (CC) provenientes da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC).

MATERIAL E MÉTODOS

Aproximadamente 60 ovos de cada linhagem, de corte (TT) e de postura (CC), foram fornecidos pela Embrapa Suínos e Aves e incubados a 37°C, sob atmosfera úmida. Após a eclosão, os pintos foram criados em galpão de concreto do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, onde receberam ração inicial comercial para frango de corte e água à vontade. Ao completarem 21 dias de idade, as aves tiveram a hipófise e o hipotálamo extraídos com auxílio de material cirúrgico e armazenados em nitrogênio líquido. O RNA total dos tecidos de cada linhagem foi separadamente extraído segundo protocolo descrito por Chomczynski & Sacchi (1987) e a população de mRNA poli (A)⁺ isolada, utilizando-se uma resina oligo-d(T) (*Oligotex*). As bibliotecas de cDNA foram contruídas segundo protocolo descrito pelos fabricantes do *Kit Superscript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen)*. Os clones obtidos tiveram suas extremidades 5' seqüenciadas utilizando-se o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)* e *primer T7 (5'-TAATACGACTCATATAGGG-3')*. As seqüências obtidas foram analisadas quanto à qualidade de bases utilizando-se o programa Phred (Ewing et al, 1998) e aquelas consideradas válidas (mínimo de 150pb com qualidade >20) foram agrupadas por meio do programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). As seqüências únicas resultantes deste agrupamento (*contigs + singletons*) foram comparadas com as disponíveis no banco não redundante (nr) do *GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)* por meio do algoritmo Blastx (Altschul et al., 1990). Foi efetuada uma análise comparativa entre as seqüências das duas linhagens e demais bibliotecas já construídas no Laboratório quanto ao padrão de expressão, de acordo com a freqüência relativa das ESTs. SNPs foram identificados analisando-se a discrepância de bases, com qualidade acima de 20 (Phred), entre ESTs das duas linhagens. Foram considerados como SNPs apenas aqueles que apareceram mais de uma vez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 4.874 clones tiveram suas extremidades 5' seqüenciadas, sendo válidos, após análise de qualidade (Phred), 2.133 da linhagem de corte (TT) e 2037 da linhagem de postura (CC).

Após o agrupamento das seqüências (CAP3), a biblioteca da linhagem de corte (TT) apresentou 1.643 seqüências únicas (*contigs + singletons*). Destas, 1.477 seqüências não apresentaram similaridade com nenhuma outra desta biblioteca (*singletons*) e 656 foram agrupadas em 166 grupos (*contigs*), cujo número de seqüências constituintes variou de 2 a 59. Já a biblioteca da linhagem de postura (CC) apresentou 1.565 seqüências únicas, sendo 1.401 *singletons* e 636 seqüências distribuídas em 164 *contigs*, variando de 2 a 64 seqüências constituintes. Esses agrupamentos indicaram índices de novidade de 77,03% para a biblioteca da linhagem de corte (TT) e de 82,46% para a de postura (CC). As seqüências de ambas as bibliotecas também foram agrupadas, revelando um índice de novidade de 79,75%.

Uma análise comparativa quanto a freqüência relativa das ESTs foi realizada utilizando-se todas as seqüências de *G. gallus* obtidas pelo laboratório (total de 13.521 ESTs; <https://e5000.fapesp.pipeline/GG>), estratégia conhecida como "northern digital" (Audic & Claverie, 1997). Das seqüências presentes em 680 *contigs* (agrupamento das ESTs das bibliotecas de hipófise e hipotálamo das duas linhagens com as demais obtidas no laboratório), aquelas presentes em 472 (69,41%) foram identificadas também em outros tecidos (somitos, membros e musculatura peitoral). Isto sugere que estas ESTs estão sendo coordenadamente expressas nos diferentes tecidos estudados. As seqüências presentes em 94 *contigs* (13,82%) foram identificadas apenas nas bibliotecas da hipófise e hipotálamo, sendo, desta forma, consideradas biblioteca específicas. Já as seqüências dos 114 *contigs* restantes (16,76%) mostraram-se biblioteca e linhagem específicas, uma vez que foram identificadas especificamente em uma das linhagens em estudo.

Dentre as ESTs identificadas como biblioteca e biblioteca/linhagem específicas, foram encontradas seqüências que codificam proteínas conhecidas por participarem das vias moleculares dos processos de crescimento e reprodução. Os principais exemplos são kinases de proteínas dependentes de cálcio/calmodulina, receptores acoplados a proteínas G, cAMP fosfodiesterase,

calmodulina 2 e fosfoinositídeo-3-quinase. ESTs relacionadas a proteínas envolvidas na transcrição gênica, tais como transcriptase reversa, proteína de fusão E2A/HLF e fator de *splicing* de 45kD também foram identificados nesse grupo.

Duas ESTs referentes ao gene 1 regulado *downstream* pelo *N-myc* (NDR1) foram identificadas apenas na linhagem de postura (CC). Por atuar como um possível inibidor do crescimento (SwissProt, [Q92597](#)), este gene (ou via molecular) pode ser um dos responsáveis pela nítida diferença de potencial de crescimento observada entre as linhagens.

Das seqüências constituintes dos 680 *contigs*, 10,29% (70 *contigs*) não apresentaram similaridade com as disponíveis no banco não redundante (nr) do *GenBank*. Este grupo de ESTs representa uma importante ferramenta para a identificação de genes ainda não descritos para *Gallus gallus*.

Outra abordagem empregada no intuito de levantar possíveis causas das diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens foi a identificação de SNPs linhagem específicos. Foram identificados 27 *contigs* contendo seqüências que apresentaram SNPs linhagem específicos. A maior parte dos SNPs foi encontrada em ESTs relacionadas a proteínas mitocondriais (seis), estruturais ou moduladoras da estrutura de outras proteínas (cinco), constituintes neuronais (quatro), ribossomais (duas) e ligadora de ferro (uma). Também foram observados SNPs em proteínas hipotéticas (cinco); proteínas sem função biológica descrita), ligadoras de cálcio (duas), relacionada ao metabolismo de lipídeos (uma) e em uma EST que não apresentou similaridade com nenhuma seqüência do banco consultado. Este segundo grupo parece estar mais relacionado às diferenças observadas entre as linhagens, porém, para uma melhor compreensão da influência destes polimorfismos, estudos mais direcionados, como a análise de genes candidatos, devem ser efetuados.

CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou a construção e anotação de um banco de ESTs da hipófise e hipotálamo que poderá ser utilizado para comparar a expressão gênica entre as linhagens.

Vários genes importantes para o crescimento de aves foram identificados, entre eles o NDR1, que exerce um controle negativo do crescimento. Este gene apresentou maior expressão na linhagem de postura, podendo assim estar associado ao diferente potencial de crescimento das linhagens.

Os SNPs constituem a forma mais freqüente de variação do genoma e estão sendo considerados a nova geração de marcadores moleculares. Aqueles identificados neste estudo poderão ser utilizados para mapeamento gênico, estudo de genes candidatos e de segregação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.D.; KELLY, J.M.; GOCAYNE, J.D. et al. Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. **Science**, v.252, p.1651-1656, 1991.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- AUDIC, S. & CLAVERIE, J.M. The significance of digital gene expression profile. **Genome Research**, v.7, n.10, p.986-995, 1997.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v.8, n.3, p.175-185, 1998.
- HUANG, X. & MADAN, A. Cap3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, n.9, p.868-877, 1999.