



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



GENES DE REFERÊNCIA PARA EXPRESSÃO GÊNICA EM CODORNAS DE CORTE

MAÍSE DOS SANTOS MACÁRIO

Mestrado

2016

**PROZOOTEC - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



MAÍSE DOS SANTOS MACÁRIO

**GENES DE REFERÊNCIA PARA EXPRESSÃO GÊNICA
EM CODORNAS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador:

Profº. Drº. Leandro Teixeira Barbosa

Co-orientador:

Dr. Carlos Souza do Nascimento

SÃO CRISTÓVÃO-SE
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA SISTEMA DE BIBLIOTECAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M115g Macário, Maíse dos Santos
Genes de referência para expressão gênica em codornas de corte / Maíse dos Santos Macário ; orientador Leandro Teixeira Barbosa. – São Cristóvão, 2016.
51 f. : il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia)– Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Zootecnia. 2. Codorna. 3. Genética animal. 4. Expressão gênica. I. Barbosa, Leandro Teixeira, orient. II. Título.

CDU 636.082

MAÍSE DOS SANTOS MACÁRIO

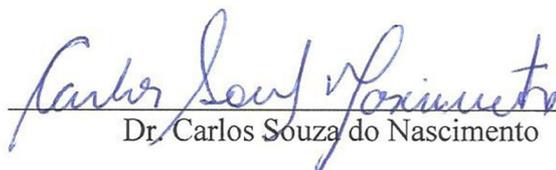
GENES DE REFERÊNCIA PARA EXPRESSÃO GÊNICA EM
CODORNAS DE CORTE

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Sergipe como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Zootecnia.

APROVADA em 16 de Fevereiro de 2016.



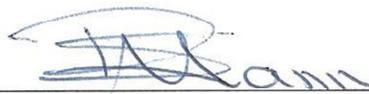
Prof.^o Dr. Leandro Teixeira Barbosa



Dr. Carlos Souza do Nascimento



Prof.^a Dra. Ana Paula Del Vesco



Prof.^a Dra. Renata Silva-Mann

SÃO CRISTÓVÃO-SE
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me inspirou em cada pensamento e não permitiu que eu desistisse.

A minha família. Em especial a minha mãe e meu pai que me formaram em caráter e valores, mostraram a dinâmica da vida e me incentivaram a continuar.

A todos que me orientaram: Professor Leandro Teixeira Barbosa, Ana Paula Del vesco, Carlos Nascimento, Renata Silva-Mann, Claudson Brito e Roberta Fernandes; que com sabedoria e experiência me instruíram e aconselharam para que eu pudesse evoluir em todos os sentidos.

A todos os amigos que fiz ao longo desta etapa. Amigos de mestrado (Jamilly, Narjara, Diana, Jorge e Adriano) e de laboratório (Ísis, Geneane e Aparecido), que me ajudaram a crescer cientificamente e também como pessoa.

Aos amigos que a vida me proporcionou Francislene Alves e Wolney Reis que me ajudaram a enxergar a saída para os problemas adquiridos ao longo desta etapa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, pois ninguém vence sozinho. Obrigada!

BIOGRAFIA

MAÍSE DOS SANTOS MACÁRIO, filha de Leandro Macário dos Santos e Vânia Lúcia dos Santos, nasceu em Aracaju, Estado de Sergipe, no dia 25 de abril de 1992.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Sergipe, no período de 2009 a 2014.

Em março de 2014 iniciou o mestrado no programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Sergipe, na área de concentração: Produção Animal – Melhoramento Genético Animal, sob a orientação do Professor Dr. Leandro Teixeira Barbosa.

Em Fevereiro de 2016, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Genética na Coturnicultura.....	2
2.2. PCR quantitativo em tempo real.....	4
2.2.1. Normalização.....	8
2.2.1.1. Gene de referência.....	9
2.2.1.1.1. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	11
2.2.1.1.2. Beta actina	11
2.2.1.1.3. Subunidade ribossomal 18S.....	12
2.2.1.1.4. Proteínas ribossômicas mitocondriais	13
2.3. Estabilidade de expressão	13
2.3.1. GeNorm	14
2.3.2. BestKeeper	14
2.3.3. NormFinder	15
2.3.4. Método ΔCq	15
2.4. Influência do tipo de tecido na expressão gênica	16
2.5. Sexo e expressão gênica	17
3. REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1: Genes de referência para análise de expressão gênica em codornas de corte	24
1.1. Resumo	25
1.2. Abstract.....	26
1.3. Introdução.....	27
1.4. Material e Métodos.....	28
1.4.1. Coleta.....	28
1.4.2. Extração de RNA e síntese de Cdna.....	28
1.4.3. PCR quantitativo em tempo real.....	29
1.4.4. Estabilidade de expressão	31

1.5. Resultados e Discussão.....	32
1.5.1. Eficiência de amplificação e especificidade da reação.....	32
1.5.2. Expressão dos genes de referência	32
1.5.3. Estabilidade de expressão dos genes de referência	34
1.6. Conclusão	40
1.7. Referências	41
ANEXOS	43

RESUMO

MACÁRIO, Maise dos S. **Genes de referência para expressão gênica em codornas de corte**. Sergipe: UFS, 2016. 56 p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

A coturnicultura de corte está em crescente desenvolvimento e necessita de maiores estudos no campo genético para o direcionamento produtivo. Sendo a técnica da PCR em tempo real uma das mais importantes na análise da expressão gênica animal, estudos e experimentações relacionadas a seus componentes se fazem necessários. Dentre esses componentes encontra-se o gene de referência, normalizador de dados que possui grande impacto nos resultados e tem influência direta no sucesso da análise, devendo este possuir expressão significativa no tecido de forma invariável em todas as condições experimentais. Dentre as condições experimentais, o sexo (macho e fêmea) pode ser considerado, uma vez que existem pesquisas voltadas à busca de respostas do comportamento gênico animal de ambos os sexos. Dessa forma se faz necessária a utilização de um único conjunto de genes de referência para normalizar os dados de expressão de ambas as amostras (machos e fêmeas), eliminando o efeito de sexo. Assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar a estabilidade e recomendar genes de referência para PCR quantitativo em tempo real em diferentes tecidos de codornas de corte de ambos os sexos. Foram analisadas as estabilidades de 10 genes constitutivos (GAPDH, RPL5, MRPS27, MRPS30, TFRC, HMBS, EEF1, LDHA, B2M e UBC) em quatro tecidos (coração, coxa, cérebro e baço), de codornas machos e fêmeas, a partir da ferramenta RefFinder disponível online. O RefFinder se baseia nos resultados dos programas e métodos comumente utilizados para esta finalidade (Bestkeeper, NormFinder, GeNorm e método ΔCq) e a análise foi feita separadamente para cada tecido. Os resultados confirmam o conhecimento prévio de que diferentes tecidos expressam genes diferentes, notável a partir das diferentes recomendações para cada tecido. Entretanto, é importante notar que, apesar de o sexo influenciar na expressão de genes, foi possível observar genes constitutivos estáveis para ambos os sexos. Os genes que se mostraram mais estáveis foram: MRPS30, EEF1 e HMBS no músculo da coxa; B2M, UBC e GAPDH no cérebro; MRPS30, TFRC e HMBS no coração; e EEF1, LDHA e HMBS no baço; sendo, portanto, recomendados para serem empregados como genes de referência em estudos de expressão gênica de codornas de corte machos e fêmeas. A recomendação de genes estáveis que podem ser utilizados em ambos os sexos de codornas facilita a execução de estudos genéticos posteriores que necessitem avaliar os animais eliminando o efeito de sexo, influenciando, conseqüentemente, no desenvolvimento de toda a cadeia produtiva.

Palavras-chave: Codorna europeia; gene endógeno; PCR em tempo real; estabilidade de expressão.

ABSTRACT

MACÁRIO, Maíse dos S. **Reference genes for gene expression in quails**. Sergipe: UFS, 2016. 56 p. (Dissertation – Master em Animal Science).

The production of common quail is on increasing development and needs further genetics studies for productive direction. As the PCR technique in real time the most important in the analysis of animal gene expression, studies and experiments related components are needed. Among these components is the reference gene, normalizer data that has great impact on the results and has direct influence on the success of the analysis, which must have significant expression in tissue and invariably in all the experimental conditions. Among the experimental conditions, sex (male and female) can be considered, since there are research about responses in the animal gene expression in both sexes. Thus it is necessary to use a single set of reference genes for normalizing expression data from both samples (male and female), by eliminating the effect of sex. So, We aim with this study was to evaluate the stability and recommend reference genes for quantitative real-time PCR in different quails tissues of both sexes. The stability of 10 housekeeping genes (GAPDH, RPL5, MRPS27, MRPS30, TFRC, HMBS, EEF1, LDHA, B2M and UBC) was analyzed in four tissues (heart, thigh, brain and spleen) of males and females quails, from online available RefFinder tool. The RefFinder is based on the results of programs and methods commonly used for this purpose (Bestkeeper, NormFinder, GeNorm and ΔCq method) and the analysis was done separately for each tissue. The results confirm prior knowledge that different tissues express different genes, that it was noted from the different recommendations for each tissue. However, it is important to note that although the sex be able to influence the expression of genes, we observed stable constitutive genes for both sexes. The most stable housekeeping genes were: MRPS30, EEF1 and HMBS in thigh muscle; B2M, GAPDH and UBC in brain; MRPS30, TFRC and HMBS in heart; and EEF1, LDHA and HMBS in spleen, It is therefore recommended to be used as reference genes for gene expression studies of male and female quails. The recommendation of stable genes that can be used in both sexes quail facilitates the execution of subsequent genetic studies needed to assess the animals eliminating the effect of sex, influencing, consequently, in the development on the entire production.

Keywords: European quail, endogenous gene, real-time PCR, expression of stability.

1. INTRODUÇÃO

A coturnicultura vem ganhando destaque produtivo no Brasil e mundo, com crescente tamanho populacional, sendo a codorna de corte (*Coturnix coturnix coturnix*) uma linhagem em ascensão e já bastante promissora pelo fato de apresentarem maior velocidade de crescimento, maior consumo de ração e maior peso vivo (250 a 300 g) se comparado à linhagem de postura (OLIVEIRA, 2001). Assim, a produção de codornas se apresenta como alvo de pesquisas aliadas à intensificação dos sistemas de produção da espécie.

Assumindo o fator genético como parte influenciável no fenótipo animal, estudos acerca dessas informações se fazem necessários para o desenvolvimento dos sistemas de produção, visto que o conhecimento genético é capaz de fornecer respostas e subsídios metabólicos que podem direcionar as práticas de produção. Em estudos gênicos, a análise de expressão é bastante recorrente, tendo como principal técnica a PCR quantitativa em tempo real que amplifica a sequência do genoma de interesse em cerca de 1 bilhão de vezes e a quantificação desses resultados pode ser obtida em tempo real (LADEIRA et al., 2011). No entanto, dentro desta técnica o gene normalizador possui grande impacto nos resultados e tem influência direta no sucesso da análise. Este normalizador é um gene de referência que deve possuir expressão significativa no tecido de forma invariável e, devido a expressão de genes ser influenciada por condições metabólicas e fisiológicas, necessita ser avaliado em cada condição experimental.

Existem pesquisas voltadas à busca de respostas do comportamento gênico animal de ambos os sexos. Dessa forma se faz necessária a utilização de um único conjunto de genes de referência para normalizar os dados de expressão de ambas as amostras (machos e fêmeas), eliminando o efeito de sexo. Contudo, os bancos de dados com as informações da expressão gênica para codorna são ainda insipientes, a começar pelos dados de expressão de genes constitutivos (utilizados como genes de referência), o que reforça a importância de experimentos que investiguem a ação dos mesmos, uma vez que estes são considerados a base da técnica que, por sua vez, influenciarão estudos genéticos posteriores relacionados à espécie.

Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar a estabilidade e recomendar genes de referência para PCR quantitativo em tempo real em diferentes tecidos de codornas de corte de ambos os sexos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Genética na coturnicultura

As codornas têm origem no norte da África, da Europa e da Ásia, pertencem à Família dos Fasianídeos (Fasianidae) e da subfamília dos Perdicionidae, sendo portanto, da mesma família das galinhas e perdizes. São aves consideradas de rápido crescimento, maturidade sexual precoce, fácil adaptação às condições de criação e grande resistência a enfermidades (MAKYIAMA, 2012). A espécie *Coturnix coturnix japonica* é a mais difundida no Brasil e, esta é caracterizada por possuir baixo peso corporal (150g), porém, elevada produção de ovos. Outras duas espécies disponíveis à exploração da coturnicultura industrial são: *Colinus virginianus* (Codorna americana) e *Coturnix coturnix coturnix* (codorna europeia) (VILELLA, 1998).

Devido à crescente demanda do mercado por carnes diferenciadas, a coturnicultura vem crescendo nos últimos tempos, pois é um tipo de produção atrativa, que demanda pouco espaço, baixa mão-de-obra e baixo investimento inicial, maior velocidade de crescimento, menor conversão alimentar e maior peso vivo (250 a 300 g) se comparado à linhagem de postura e reduzido consumo de ração, em relação a frangos de corte (OLIVEIRA, 2001).

Dentre os rebanhos pecuários do País, a coturnicultura obteve o maior crescimento nos últimos anos, onde o efetivo de codornas foi de 20,34 milhões de cabeças em 2014, um aumento de 11,9% em relação ao registrado em 2013, sendo a maior concentração deste efetivo na região sudeste (78,2%). No Nordeste, o crescimento foi de 11,2% (IBGE, 2014). Na FIGURA 1 está apresentada a evolução do efetivo de codornas no Brasil.

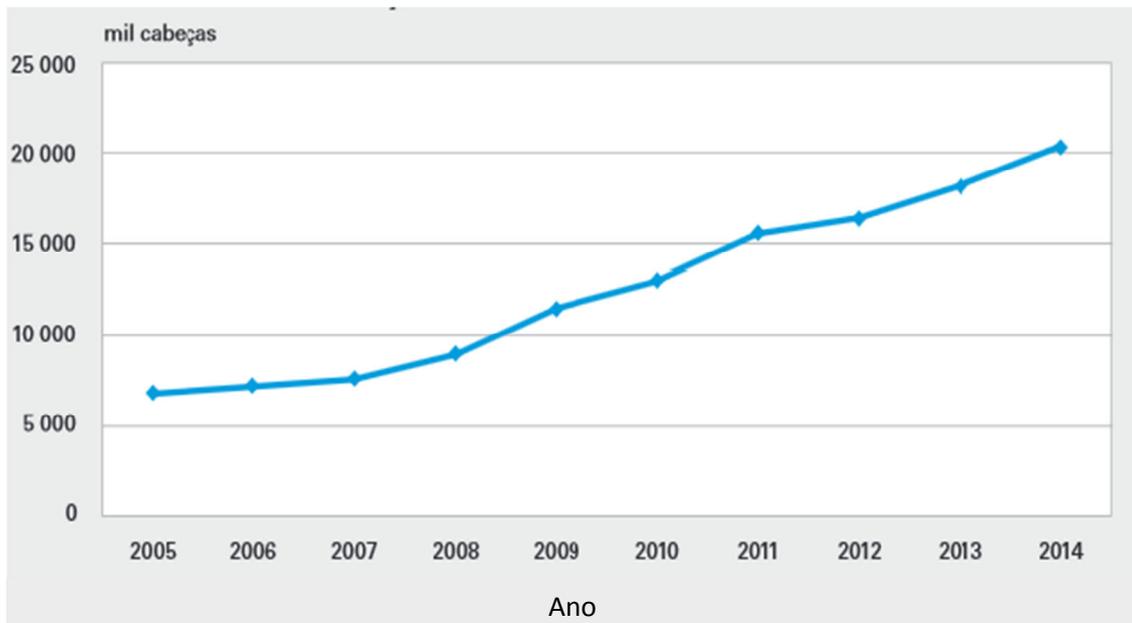


FIGURA 1: Evolução do efetivo de codornas no Brasil no período de 2005 – 2014 (Adaptado de IBGE - produção da pecuária municipal, 2014)

No que diz respeito ao campo científico, a codorna também contribui como modelo animal para vários estudos em biologia sazonal, embriologia, biologia comportamental e neuroendócrina, genética e biomedicina (KAWAHARA-MIKI, 2013). Sendo a produtividade animal dependente de vários fatores, onde a genética possui grande impacto, estudos voltados a essa área são de extrema importância e, se fazem necessários para o desenvolvimento da coturnicultura como um todo. Estes estão ganhando espaço em alguns países como: China, Japão, França e Espanha, sendo o Brasil também iniciante nesse campo (IBGE, 2013). No entanto, para que se chegue a um produto final a partir de linhagens comerciais melhoradas são necessários ainda muitos estudos, aperfeiçoamento de programas de melhoramento genético e incentivo financeiro e políticas governamentais continuadas (MAKYIAMA, 2012). Apesar disso, muito já está sendo desenvolvido e é notável os impactos positivos na coturnicultura do país.

Dentro da zootecnia a aplicação dos conhecimentos genéticos do animal é imprescindível ao direcionamento das práticas de produção. Pesquisas que relacionam genética e nutrição, como a nutrigenômica e nutrigenética, também começaram a progredir na coturnicultura e o fornecimento de informações biológicas necessárias ao aprimoramento desses estudos em nível gênico é primordial. Sendo assim, as análises

de ordem genética se fazem imprescindíveis ao progresso produtivo, uma vez que os achados biológicos são capazes de explicar fenótipos e direcionar as práticas de produção através do conhecimento exposto acerca do seu funcionamento fisiológico.

2.2. PCR quantitativo em tempo real

A técnica de PCR quantitativo em tempo real foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e colaboradores e se baseia no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR) que multiplica ácidos nucleicos e quantifica o DNA obtido em tempo real. Assim, essa técnica combina a metodologia da PCR convencional com um mecanismo capaz de emitir e detectar a fluorescência a ser quantificada. A maioria das plataformas de instrumentação é composta por um termociclador, com sistema óptico e computador com software próprio que recolhe os dados e permite a análise final (MACKAY et al., 2007).

Esta é uma técnica amplamente empregada no campo biológico em situações onde a quantidade de DNA disponível é limitada, principalmente; utilizada na medicina forense, detecção de mutações, preparação de fragmentos de DNA para clonagem, sequenciamento e, principalmente, em análises de expressão gênica, a PCR tem se tornado uma ferramenta poderosa para análise de ácidos nucleicos devido à sua rapidez, reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade (MACKAY et al., 2007).

Por ser uma das técnicas mais utilizadas em estudos de expressão gênica, a utilização de PCR passou a ser amplamente utilizada gerando uma grande quantidade de publicações utilizando essa técnica. Esse crescimento na quantidade de publicações fez surgir consigo problemas relacionados à falta de consenso sobre a melhor forma de realizar e interpretar os resultados da PCR quantitativo em tempo real, exacerbado pela falta de detalhamento experimental, impedindo a capacidade de um leitor avaliar criticamente a qualidade dos resultados apresentados ou repetir os experimentos (BUSTIN et al., 2009). Assim, desenvolveu-se o MIQE *Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)* com o intuito de organizar e padronizar publicações que utilizem a técnica. Proposto por Bustin et al. (2009), o MIQE fornece orientações à confiabilidade dos resultados para ajudar a garantir a integridade da literatura científica, promover a coerência entre laboratórios e

aumento da transparência experimental. Portanto, ao se realizar experimentos por meio de PCR quantitativo em tempo real, deve-se atentar às diretrizes oferecidas pelo guia.

O que ocorre na PCR quantitativo em tempo real é uma transcrição reversa pela qual, a partir de uma molécula de RNA (fita simples), se forma o DNA complementar ou cDNA, a partir da enzima DNA polimerase RNA – dependente. Após isso, pode-se dar início à reação em cadeia da polimerase. Tampão, cátion bivalente – Mg^{2+} e cátion monovalente – K^+ , iniciadores de reação (primers), desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), enzima DNA polimerase e amostra de DNA são os componentes necessários para dar início a uma reação de PCR, que ocorrerá, geralmente, em 3 etapas: 1 ciclo de $95^{\circ}C$ por 10 minutos, 40 ciclos de $95^{\circ}C$ por 10 segundos e 60 segundos à $60-62^{\circ}C$, e um passo adicional à temperatura de $60-62^{\circ}C$ para a curva de dissociação de *primers* (curva de *melting*) (NASCIMENTO et al., 2010). As temperaturas podem ser alteradas a depender do gene em análise, fornecendo à reação uma condição adequada de amplificação. A inclusão da curva de dissociação é essencial para verificar a especificidade do *primer*, uma vez que ela é capaz de demonstrar se na reação houve formação de um único produto, ou se produtos inespecíficos também foram formados (NASCIMENTO et al., 2010). Um exemplo de curva de dissociação pode ser encontrado na FIGURA 2.

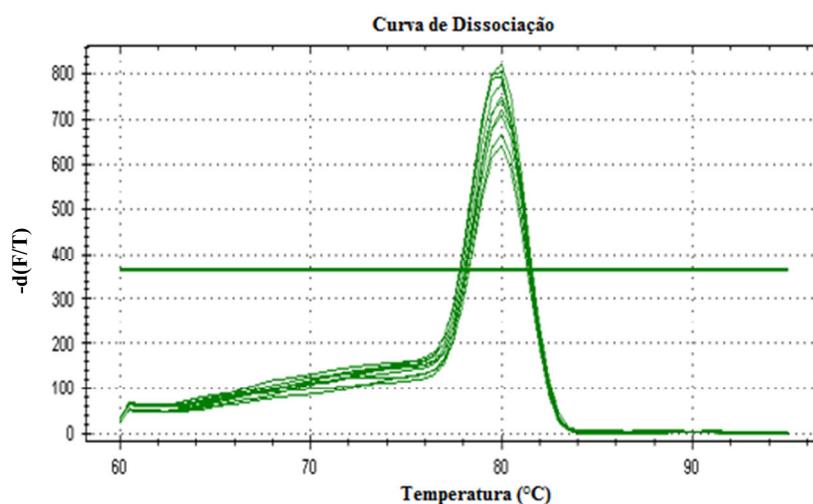


FIGURA 2: Curva de dissociação observada na PCR em tempo real para frangos-*Gallus gallus* (Arquivo pessoal). Onde $-d(F/T)$: derivada negativa da fluorescência/Temperatura

Ao final de cada ciclo se originam duas novas cadeias de DNA para cada alvo da cadeia dupla. Dessa forma, ocorre crescimento exponencial resultando ao fim de n ciclos (cerca de 40), 2^n vezes mais cópias do que havia no início, quando se obtém 100% de eficiência da amplificação (OLIVEIRA, 2010).

Além dos componentes mencionados, acrescenta-se à reação um composto fluorescente, onde os mais utilizados são o SYBR Green® e TaqMan®, que tem o objetivo de absorver e emitir luz em um comprimento de onda específico. De acordo com a quantidade de produto amplificado, modulada pelos sinais de fluorescência, é possível identificar três fases no gráfico que é gerado: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária (FIGURA 3).

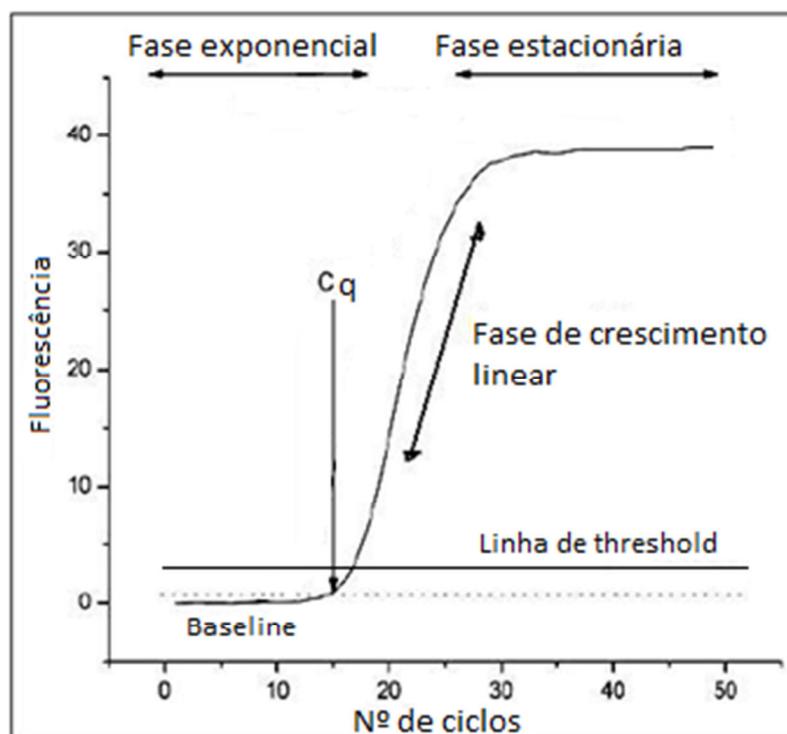


FIGURA 3: Fases da PCR em tempo real (Adaptado de Oliveira, 2010)

A *baseline* corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento (ruído de fundo), este independe da presença de sinal no sistema. Assim, durante os primeiros ciclos o sinal é fraco e não pode ser distinguido a partir do fundo. À medida que há um acúmulo na quantidade de produto formado, o sinal se desenvolve e este, de início, aumenta exponencialmente. Esta fase de crescimento exponencial é a melhor fase para análise da reação devido à sua elevada eficiência, já que a relação entre a quantidade de produto e a quantidade inicial de DNA é mais consistente (OLIVEIRA,

2010). O ponto C_q – *quantification cycle* – é o número de ciclos necessários para atingir e ultrapassar o limiar da fase exponencial (*threshold*) por meio da fluorescência detectada (KUBISTA et al., 2006). Uma vez que a fluorescência detectada se dá a partir da ligação fluoróforo – DNA, entende-se que quanto mais DNA (maior expressão) houver na amostra menos ciclos serão necessários para que a quantidade de DNA fluorescente (ligado) seja suficiente para ultrapassar o limiar, resultando num valor de C_q menor; e vice-versa. Dessa forma, o valor de C_q é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação (OLIVEIRA, 2010). De acordo com Pelt-Verkuil et al. (2008), na maioria dos protocolos de PCR em tempo real, o valor de C_q varia entre 17 ciclos (o que corresponde a aproximadamente 10.000.000 de moléculas iniciais) e 37 ciclos (correspondente a uma molécula inicial).

Na fase de crescimento linear se inicia o processo de diminuição da eficiência de amplificação devido ao consumo dos reagentes da reação e assim, o número de moléculas produzidas a cada ciclo não aumenta exponencialmente com eficiência de 100%. Daí em diante os níveis do sinal começam a saturar (KUBISTA et al., 2006). Já a fase estacionária corresponde ao final da análise, onde a saturação do sinal se torna mais evidente devido à falta de algum componente crítico que, segundo Kubista et al. (2001) podem ser os *primers* ou os dNTPs, por exemplo.

Os produtos de PCR gerados são chamados de *amplicons*. Quando esses produtos dobram em quantidade durante a fase exponencial da PCR, então se diz que a PCR foi 100% eficiente. A eficiência da amplificação (E) é um fator de extrema importância visto que prediz o sucesso da técnica e, esta pode ser estabelecida por meio de curvas de calibração, a qual é graficamente representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor de C_q em comparação ao log da quantidade inicial de ácido nucleico (APPLIED BIOSYSTEMS, 2015) (FIGURA 4).

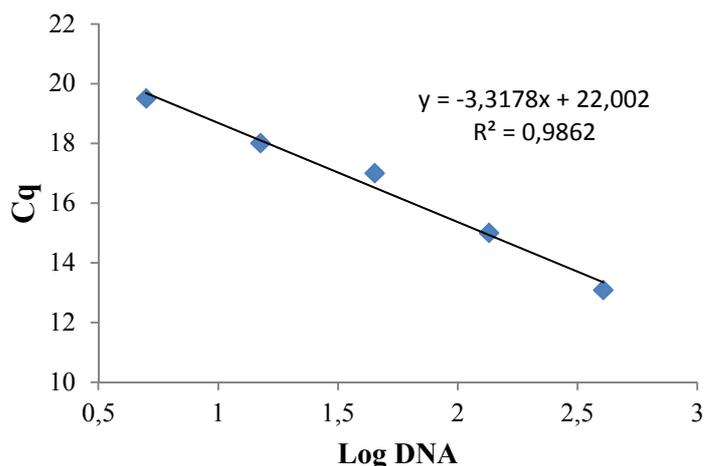


FIGURA 4: Curva padrão de PCR em tempo real de frangos aos 35 dias de idade (Arquivo pessoal)

O *slope* (inclinação) da curva é comumente usado para estimar a eficiência da amplificação, sendo que quando o declive da curva padrão apresenta valor de -3,32, a eficiência da reação é de 100%. Ao passo que, valores mais negativos que -3,32 indicam reações com menos de 100% de eficiência. Dessa forma, uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de 10 vezes no *amplicon* a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2015). O cálculo para a estimativa da eficiência a partir do declive da curva padrão (PFAFFL, 2001) é:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

De acordo com Kavanagh et al. (2011), a eficiência pode situar-se entre 90% e 110% para ser considerada num alcance aceitável para uma curva padrão na qPCR.

Na quantificação relativa são analisadas alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência e, assim, uma etapa de normalização é necessária a fim de corrigir variações entre amostras e gerar resultados confiáveis.

2.2.1. Normalização

A normalização para um controle endógeno é o tipo de normalização mais utilizada, e possibilita a correção de variabilidades inerentes ao RNA como: diferenças

na quantidade inicial da amostra, protocolos de extração que podem co-purificar inibidores e também, discrepâncias de eficiência entre as amostras durante o processo de transcrição reversa e da PCR (BUSTIN et al., 2005). Assim, a variação (instabilidade de expressão) dos genes utilizados como normalizadores deve ocorrer apenas de acordo com o erro experimental inerente à técnica. Contudo, deve-se atentar também ao fato de que ao utilizar um único gene de referência como normalizador em um experimento que pretende estudar várias condições experimentais, é maior a probabilidade de que a expressão seja variante, tornando os resultados do estudo não confiáveis. Neste caso, de acordo com o MIQE *Guidelines*, a utilização de um pequeno conjunto de genes de referência, determinados experimentalmente, que possuam baixa correlação entre si, se faz necessária.

Frequentemente, dois métodos são utilizados para a quantificação: o método da curva padrão relativa e o método Cq comparativo ($\Delta\Delta Cq$ – comparação do limiar da fase exponencial). Para a quantificação absoluta, que tem como objetivo determinar o número exato de moléculas de DNA, utiliza-se o método da curva padrão ou outros métodos que utilizam derivadas secundárias (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008). Na quantificação relativa o método $\Delta\Delta Cq$ é o mais recorrente, que consiste na comparação dos valores de normalização dos valores de Cq da amostra e do controle, normalizados a um gene endógeno apropriado. Este método também é conhecido como o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, onde $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{amostra} - \Delta Cq_{controle}$; sendo que nesta equação $\Delta Cq_{amostra}$ é o valor de Cq para a amostra em questão normalizada ao gene apropriado, e $\Delta Cq_{controle}$ é o valor de Cq para o tratamento controle normalizado também ao gene apropriado (OLIVEIRA, 2010). O número 2 como base do cálculo é devido ao crescimento exponencial que se dá a cada ciclo, sendo que, numa eficiência de amplificação de 100% o número de cópias aumenta nessa proporção (2^n , onde n é o número de ciclos).

2.2.1.1. Gene de referência

Na PCR quantitativo em tempo real é necessário introduzir métodos de normalização apropriados para a validação dos resultados, para que a técnica alcance seu máximo potencial analítico. Portanto, um gene de referência é utilizado como referência ativa, ou seja, um sinal ativo usado para normalizar os resultados experimentais. Referência ativa significa que o sinal é gerado como resultado da

amplificação da PCR e, esta tem o seu próprio conjunto de *primers* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2015). Assim, este gene é um controle interno da reação, que contém sequências diferentes do gene alvo (o que se pretende analisar). Estes demonstram a variabilidade que resulta das limitações da tecnologia utilizada e do procedimento preparatório das amostras, assegurando que qualquer variação na quantidade de material genético se relacione na mesma medida entre o objeto de pesquisa e o controle (KOZERA e RAPACZ, 2013).

O gene de referência é um fator muito importante nos estudos de expressão gênica e, assim como outras variáveis da técnica, tem sofrido algumas modificações na sua aplicação, a fim de aprimorar o resultado das análises. Até alguns anos atrás, já era sabido que para que um gene fosse utilizado como referência em uma análise de expressão, este deveria manter sua expressão estável no tecido estudado, e não variar em nenhuma condição aplicada ao experimento. Assim, a escolha deste gene se dava de forma pouco minuciosa, buscando informações nos bancos de dados e em estudos anteriores, a fim de se confirmar se o gene em questão era ou não constitutivo, ou seja, se fazia parte do metabolismo básico e processos essenciais para a sobrevivência das células; pois somente esses se encaixariam perfeitamente no quesito de invariabilidade. Esses genes endógenos eram chamados de *housekeeping genes* (genes da casa) e foram os primeiros a ser examinados como genes de referência (THELLIN et al., 1999). No entanto, essa suposição começou a ser questionada uma vez que se constatou que tais genes não faziam parte somente dos processos básicos de metabolismo e aquele gene que seria aplicável como normalizador de um experimento não garantia sua funcionalidade em outro. Assim, de acordo com Kozera e Rapacz (2013), os trabalhos se mostravam deficientes quanto à validação e havia necessidade de que a escolha fosse feita com maior cuidado levando em consideração todos os aspectos específicos do experimento.

Para que um gene seja considerado candidato a gene de referência em determinado estudo, este deve possuir alguns pré requisitos básicos como: ser expresso na amostra, não ser co-regulado com o gene alvo e apresentar variação de expressão mínima (CHERVONEVA et al., 2010). Alguns dos genes geralmente utilizados como referência em estudos de expressão gênica são: GAPDH, ACTB, MRPS27, MRPS30, HMBS, TFRC, subunidade ribossomal 18S e 28S, HPRT1, dentre outros. Contudo, não somente os genes constitutivos apresentam tais características. Um gene regulado, ou seja, um gene que é ativado em fases especiais do desenvolvimento em resposta aos

estímulos específicos, pode também ser utilizado como gene de referência, bastando apenas que se comprove por meio de experimentos, que o mesmo possui as características necessárias para exercer este papel.

2.2.1.1.1. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) codifica um membro da família dessas proteínas e o produto deste gene catalisa um importante passo no metabolismo de produção de energia que é a fosforilação oxidativa reversível, à partir do gliceraldeído 3 fosfato, na presença de fosfato inorgânico e nicotinamida adenina dinucleotídico (NAD). Além disso, a proteína produzida por esse gene possui um peptídeo que tem atividade antimicrobiana contra *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Cândida albicans* (<http://www.genecard.org>).

Este é um dos genes de referência mais usados, dito inclusive como “clássico” (de JONGE et al., 2007), e em vários estudos este apresenta bons resultados; no entanto, em algumas análises não é recomendado devido à variabilidade de expressão causada pela exposição a fatores experimentais específicos (KOZERA e RAPACZ, 2013). Esse achado reforça o fato de que genes constitutivos não estão envolvidos somente nos processos fundamentais da célula.

O GAPDH apresenta maior expressão no músculo esquelético e expressão baixa em tecidos como coração, cérebro, rins, fígado, pulmão e baço (<http://www.ensemble.org>). Assim, já é comprovado que em diferentes tecidos os níveis de expressão deste gene apresenta variabilidade significativa o desclassificando de ser utilizado como controle endógeno (BARBER et al., 2005). Mesmo em estudos que pretendam avaliar a diferença de expressão gênica em um mesmo tecido, deve-se proceder antes de tudo, com a análise de variabilidade, pois esta também é dependente do tecido em questão.

2.2.1.1.2. Beta actina

Beta actina (ACTB) é o gene que codifica uma das seis proteínas actina existentes e, estas são proteínas que estão envolvidas na motilidade celular, estrutura e integridade; é a maior constituinte do aparelho contrátil e uma das duas actinas não

musculares do citoesqueleto (<http://www.genecards.org>). Em aves, sua expressão se dá em grau mais elevado no coração, rim, fígado, cérebro e músculo esquelético (<http://www.ensemble.org>) e, este gene tem se mostrado invariável em outros tecidos, como tireóide (WEBER et al., 2014). Assim, o ACTB é expresso em todos os tecidos, mesmo que em alguns essa expressão seja pequena.

Contudo, alguns experimentos ao avaliarem a estabilidade de genes de referência, encontram alta variabilidade para o gene da beta actina, que impossibilita de utilizá-lo com controle endógeno, apesar da sua elevada expressão (NAJAFPANAH et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015).

2.2.1.1.3. Subunidade Ribossomal 18S

A subunidade ribossomal 18S é a mais comum dentre as subunidades ribossomais e é amplamente utilizada como normalizador de estudos de RTqPCR. Esta subunidade é o RNA estrutural para um pequeno componente dos ribossomos citoplasmáticos eucarióticos e, portanto, um dos componentes básicos de todas as células. No entanto, a utilização do 18S rRNA como gene de referência apresenta várias dificuldades. De acordo com Paolacci et al. (2009), tipicamente a expressão do RNA ribossômico (rRNA) é muito maior que a do gene alvo, e sua degradação é reduzida em comparação com o RNA mensageiro (mRNA), resultando em maiores proporções do rRNA do que do gene estudado, contradizendo os pressupostos da normalização. Além disso, o controle da síntese do mRNA e do rRNA independem um do outro pois, no RNA ribossômico a transcrição está ligada à enzima RNA polimerase I, já no mRNA a enzima de síntese é a RNA polimerase II (RADONIC' et al., 2004). Também, as unidades ribossomais não são poliadeniladas como o mRNA necessitando que o cDNA seja confeccionado à partir de *primers* específicos, o que não é tão simples e pode replicar também algumas sequências indesejadas (RADONIC' et al., 2004). E ainda, segundo Nicot et al. (2005), a transcrição dessa subunidade ribossomal pode ser regulada por algumas substâncias químicas e biológicas. Assim, é necessário muito cuidado e estudo prévio ao empregar este gene na normalização dos dados.

Estudos em que se espera que os níveis de expressão do gene em análise sejam elevados, pode-se empregar como normalizador o gene 18S rRNA sem muitas dificuldades. Este é recomendado para normalizar estudos com vegetais como arroz

(KIM et al., 2003) e batata (NICOT et al., 2005), como também em estudos sobre infectologia viral (KUCHIPUDI et al., 2012) e linfócitos (BAS et al., 2004).

2.2.1.1.4. Proteínas ribossômicas mitocondriais

A proteína ribossômica mitocondrial de pequena subunidade 27 (MRPS27) codifica uma proteína de subunidade 28S que pode ser uma parceira funcional da proteína 3 associada à morte (DAP3) e sua queda causa diminuição na abundância no complexo respiratório e atividade da enzima citocromo c oxidase (DAVIES et al., 2012). Assim, está expresso em basicamente todos os tecidos.

No tecido muscular o gene MRPS27 apresenta expressão média sendo esta pouco variável (NASCIMENTO et al., 2015) e, segundo Ninov et al. (2009), a utilização deste gene conjugado a outro pode trazer bons resultados à normalização, se o segundo gene for o RPL5 ou ACTB, pois esses dois genes (RPL5 e ACTB) apresentam alta correlação.

Outra proteína ribossômica mitocondrial geralmente utilizada como gene de referência é a proteína ribossômica mitocondrial de pequena subunidade 30 (MRPS30) que, assim como o MRPS27, é um gene nuclear e ajuda na síntese de proteínas dentro da mitocôndria. O MRPS30 também codifica uma proteína de subunidade 28S, no entanto sua associação ocorre à proteína apoptótica p52 em frangos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>).

2.3. Estabilidade de expressão

Quando os dados de quantificação são expressos por quantidade de RNA total extraído, o RNA ribossomal predominante (5S, 18S e 28S), conhecido por variar em sua proporção no RNA total, pode causar mudanças significativas nos resultados (PFAFFL et al., 2004). Dessa forma, um controle mais rígido do processo se faz necessário, por meio da utilização de normalizadores (genes de referência) padronizados em sua variabilidade, a fim de tornar os resultados de expressão gênica confiáveis.

Sabe-se que a estabilidade de expressão de genes de referência é um dos pré-requisitos para a inclusão do mesmo como normalizador em estudos de PCR quantitativo e, devido à comprovação de que os genes constitutivos usualmente

utilizados, podem ser regulados em certas ocasiões (FOSS et al., 1998; SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000) a avaliação da estabilidade é imprescindível ao experimento.

A estabilidade de expressão pode ser analisada de diversas maneiras, no entanto, alguns programas e algoritmos foram desenvolvidos para esse fim e são bastante utilizados.

2.3.1. GeNorm

GeNorm é um software desenvolvido por Vandesompele et al. (2002), capaz de identificar, dentro de um conjunto de amostras, o gene de referência mais expresso de forma mais estável.

Para a análise da estabilidade, o algoritmo GeNorm classifica os genes a partir da sua estabilidade de expressão média (M). De acordo com o proposto por Vandesompele et al. (2002), o valor de M é a média da variação de pares (de um gene endógeno em particular com todos os genes controles testados), onde se obtém um desvio padrão para cada par de genes controles e, o gene testado na combinação que apresentar menor média é tido como o mais estável sendo que esse valor deve situar-se abaixo de 1,5 para que o gene seja considerado estável.

Além disso, o GeNorm determina o número mínimo de genes necessário para calcular um fator de normalização confiável, e qual seria melhor combinação desses genes partindo do princípio de que os genes de referência ideais possuem nível de expressão idêntica em todas as amostras.

2.3.2. BestKeeper

Bestkeeper é um software desenvolvido por Pfaffl et al. (2004), que analisa a estabilidade de expressão por meio da determinação dos padrões mais adequados dos genes candidatos a referência e da combinação destes (correlação) com um índice que, por sua vez pode ser comparado para os genes alvo, a fim de decidir se os genes de referência testados são expressos diferencialmente sob um tratamento aplicado (PFAFFL et al., 2004). Essa ferramenta se baseia no desvio padrão que deve ser menor ou igual a um (≤ 1). Assim, o software calcula a variação para todos os genes de referência baseadas na média geométrica do valor de Cq.

Como característica positiva deste software, existe o fato de que no processamento subsequente, o conjunto desses dados podem ser importados para outras ferramentas de softwares como o REST (PFAFFL et al., 2002), GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) ou Q-Gene (MULLER et al., 2002).

2.3.3. NormFinder

NormFinder é um aplicativo desenvolvido por Andersen et al. (2004), baseado no Microsoft Excel que emprega uma abordagem baseada em modelo estatístico. Ele preconiza que os genes que mostram uma alta variação entre as amostras analisadas devem ser evitadas. Além disso, supõe que a determinação de estabilidade de expressão dos genes controles candidatos, avaliadas somente entre os grupos experimentais, pode levar a uma incorreta interpretação dos resultados, já que em prática, todos os genes testados irão apresentar alguma variação na expressão.

Assim, o NormFinder propõe avaliar a estabilidade dentro de grupos e entre grupos à princípio e, a determinação final da estabilidade do gene combina os dois valores de estabilidade (inter e intragrupos), adicionando as duas fontes de variação ocorrentes, o que representa uma medida prática de erro sistemático que será introduzida quando se utiliza o gene investigado (ANDERSEN et al., 2004). Além disso, o desvio padrão acumulado funciona como um bom indicador do número ideal de genes a ser empregado na normalização dos dados.

2.3.4. Método ΔCq

O método de delta Cq (ΔCq) foi proposto por Silver et al. (2006), e este avalia os genes de referência mais estáveis por meio da comparação da expressão relativa de pares de genes dentro de cada amostra de tecido. De modo que quando o valor de ΔCq entre os pares de genes permanece constante para todas as amostras testadas, significa que esses genes de referência são expressos de forma estável entre as amostras ou co-regulados (SILVER et al., 2006). Porém, se o ΔCq oscila, isso quer dizer que um ou ambos os genes são expressos de forma variável. A análise por pares permite a introdução de um terceiro, quarto ou quinto gene, após as falhas, para a comparação entre os pares que irão fornecer a maior estabilidade. Sendo assim, este processo de

eliminação apresenta como vantagem a possibilidade de que vários genes sejam testados e comparados uns com os outros com base no ΔCq

2.4. Influência do tipo de tecido na expressão gênica

Nos organismos eucariotos, existem genes que se expressam apenas em determinados tecidos e esses são chamados de genes tecido-específicos e estão sob regulação tecido-específica. No entanto, existem também genes que se expressam somente durante determinados períodos e, estes são controlados por meio de regulação temporal (COSTA e PACHECO, 2013). Assim, diferentes tecidos apresentam componentes proteicos e estruturais também diferentes, resultando em um perfil de expressão gênica específico adequado a cada necessidade.

Não há dúvida de que diferentes tecidos expressam diferentes genes. Alguns trabalhos como o de Vandesompele et al. (2002), por exemplo, confirmam esse quesito também para genes constitutivos, onde 10 desses genes tiveram sua expressão analisada em alguns tecidos (neuroblastoma, fibroblastos, leucócitos, ossos) e se pôde constatar que em cada tecido a expressão dos genes foi muito variável; também dentro de um mesmo tecido, o nível de expressão do gene mais expresso foi muito maior que o nível do menos expresso (400 vezes mais), sugerindo que a variabilidade de expressão ocorre não somente inter tecidual, mas também dentro de uma única classe de tecido. Jemiolo e Trappe (2004), avaliando os níveis de expressão dos genes B2M, GAPDH, rRNA, 18S e ACTB em fibras musculares e em diferentes condições fisiológicas de homens adultos, constataram que a quantidade de transcrito do gene B2M pode chegar a ser 52 vezes maior no tecido antes do que após 4 h de exercício.

Em cabras da raça Boer, a expressão gênica assim como a variabilidade de oito genes de referência (18S, TBP, HMBS, YWHAZ, ACTB, HPRT1, GAPDH e EEF1A2) foram avaliadas por Zhang et al. (2013) em 10 tecidos (estômago, intestino delgado, ovário, coração, baço, útero, pulmão, fígado, rim e músculo). Concluiu-se dependendo do tecido avaliado, diferentes genes eram mais expressos de forma estável. Também Bagés et al. (2015), analisando a expressão e estabilidade de cinco genes de referência (B2M, RPL32, SDHA, TBP e YWHAZ) em 4 tecidos (músculo do peito, coxa, gordura abdominal e fígado) de frangos, observaram uma combinação específica de genes que seria mais indicada (de expressão mais estável), a depender do tecido, para que estes

fossem utilizados como normalizadores nos ensaios de PCR em tempo real dessa espécie.

Sendo assim, a necessidade de se avaliar as variedades na expressão gênica de determinado tecido, assim como nas diferentes condições fisiológicas em que ocorrerá o experimento, para a utilização de um gene de referência adequado, se faz plenamente indispensável aos ensaios de PCR em tempo real.

2.5. Sexo e expressão gênica

As condições fisiológicas inerentes ao organismo, por apresentar particularidades no seu metabolismo, ativando e desativando proteínas específicas, resultam de diferenças na regulação gênica e, conseqüentemente, no perfil de genes expressos. Os efeitos de sexo podem se encaixar nesse contexto, uma vez que os dimorfismos sexuais estão ligados também a componentes proteicos diferencialmente expressos.

O efeito de sexo na expressão gênica requer a utilização de genes de referência capazes de normalizar a expressão em machos e, outros genes atuantes na normalização da expressão em fêmeas. No entanto, existem trabalhos que necessitam avaliar a expressão de genes em animais machos e fêmeas, eliminando o efeito do sexo na resposta esperada. Assim, se faz necessária a utilização de um único conjunto de genes de referência a ser utilizado como normalizador dos dados tanto das amostras tanto de machos quanto de fêmeas.

É crescente o interesse pela investigação do comportamento gênico em animais de ambos os sexos. Como, por exemplo, avaliações de expressão de genes envolvidos com a regulação hormonal em tecidos gonadais de frangos (GRZEGORZEWSKA et al., 2009; LIM e SONG, 2015), e de peixes (AN et al., 2008); genes envolvidos com o desenvolvimento embrionário em blastocistos bovinos (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010), e blastocistos ovinos (BEILBY et al. 2011); genes relacionados ao transporte de nutrientes avaliados em tecidos intestinais de perus (WEINTRAUT et al. 2015); e genes do metabolismo lipídico em tecido adiposo de ursos (GEHRING et al., 2015). Contudo, percebe-se a extensão das investigações dessa natureza para várias espécies animais, ressaltando a necessidade de estudos com genes candidatos a gene de referência a fim de detectar genes capazes de normalizar dados de expressão em ambos os sexos (por sua

estabilidade de expressão e nível de expressão) e auxiliar na geração de resultados adequados e confiáveis.

3. REFERÊNCIAS

AN, K. W.; NELSON, E. R.; HABIBI, H. R. et al. Molecular characterization and expression of three GnRH forms mRNA during gonad sex-change process, and effect of GnRH α on GTH subunits mRNA in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, S/n. p. 38-45, 2008.

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**, v. 64, S/n. p. 5245–5250, 2004.

APPLIED BIOSYSTEMS, **Princípio da PCR em tempo real**.

Disponível em: <http://docslide.com.br/documents/apostila-pcr.html>.

Acesso em: Outubro de 2015.

BAGÉS, S.; ESTANY, J.; TOR, M. et al. Investigating reference genes for quantitative real-time PCR analysis across four chicken tissues. **Gene**, v. 561, n. 1, p. 82-87, 2015.

BARBER, R. D.; HARMER, D. W.; COLEMAN, R. A. et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 3, p. 389 – 395, 2005.

BAS, A.; FORSBERG, G.; S. HAMMARSTROM, ET AL. Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, β -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, S/n, p. 566–573, 2004.

BEILBYA, K. H.; DE GRAAFA, S. P.; EVANSA, G. et al. Quantitative mRNA expression in ovine blastocysts produced from X- and Y-chromosome bearing sperm, both in vitro and in vivo. **Theriogenology**, v. 76, S/n. p. 471-481, 2011.

BERMEJO-ALVAREZA, P.; RIZOSA, D.; RATHB, D. et al. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, v. 107, n. 8, p. 3394–3399, 2010.

BUSTIN, S. A.; BENES. V.; GARSON, J. A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611-622, 2009.

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

CHERVONEVA, I.; LI, Y.; SCHULZ, S. et al. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 253, s/N, 2010.

- COSTA, E de B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 125-136, jul./dez. 2013.
- DAVIES, S. M. K.; SANCHEZ, M. I. G. L.; NARSAI, R. et al. MRPS27 is a pentatricopeptide repeat domain protein required for the translation of mitochondrially encoded proteins. **Febs Letters**, v. 586, n. 20, p. 3555–3561, 2012.
- de JONGE, H. J. M.; FEHRMANN, R. S. N.; de BONT, E. S. J. M., et al. Evidence based selection of housekeeping genes. **PLoS One**, v. 2, n. 9, 2007.
- FOSS, D. L.; BAARSCH, M. J.; MURTAUGH, M. P. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. **Animal Biotechnology**, v. 9, S/n. p. 67–78, 1998.
- GEHRING, J. L.; RIGANO, K. S.; HUTZENBILER, B. D. E. et al. A protocol for the isolation and cultivation of brown bear (*Ursus arctos*) adipocytes. **Cytotechnology**, Methods Paper, p. 1-15, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10616-015-9937-y>. Acesso em março de 2016.
- GRZEGORZEWSKA, A. K.; SECHMAN, A.; PACZOSKA-ELIASIEWICZ, H. E. et al. The expression of pituitary FSH β and LH β mRNA and gonadal FSH and LH receptor mRNA in the chicken embryo. **Reproductive Biology**, v. 9, n. 3, p.253-269, 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Vol. 41, 2013. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf. Acesso em dezembro de 2015.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Vol. 42, 2014. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf Acesso em fevereiro de 2016.
- JEMIOLO B.; TRAPPE, S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 320, n. 3, p. 1043 – 1050, 2004.
- KAVANAGH, I.; JONES, G.; NAYAB, S. N. Significance of controls and standard curves in PCR. In: KENNEDY, S. e OSWALD, N. **PCR troubleshooting and optimization**. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. p.77.
- KAWAHARA-MIKI, R.; SANO, S.; NUNOME, M.; et al. Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. **Genomics**, v. 101, n. 6, p. 345-353, 2013.

KIM, B. R.; NAM, H. Y.; KIM, S. U. et al. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 21, p. 1869–1872, 2003.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 391 – 406, 2013.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, s/n, p. 95–125, 2006.

KUBISTA, M.; STAHLBERG, A.; BAR, T.; 2001. Light-up probe based real-time Q-PCR. In: Raghavachari, R., Tan, W. (Eds.), **Genomics and Proteomics Technologies**, Proceedings of SPIE, 4264, p. 53–58.

KUCHIPUDI, S. V.; TELLABATI, M.; NELLI, R. K. et al. 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. **Virology Journal**, v. 9, n. 230, 2012.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista Medicina**, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.

LIM, W.; SONG, G. Novel genes and hormonal regulation for gonadal development during embryogenesis in chickens. **General and Comparative Endocrinology**, v. 211, S/n. p. 20-27, 2015.

MA, H.; KUAN-JIUNN, S.; CHEN, G.; et al. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**, v. 2, s/n, p. 1-15, 2006

MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D. et al. (2007). **Real-time PCR; History and Fluorogenic Chemistries**. In Mackay, I. M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology From diagnosis to characterization* 1 ed. (p. 1-40) United Kingdom: Horizon Press - Calister Academic Press.

MAKYIAMA, L. Programas de iluminação para codornas japonesas no período de recria e desempenho na fase de postura. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras.

Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/762>
Acesso em Outubro de 2015.

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**, v. 9, n. 102, p. 1-12, 2008.

MO, F; ZHAO, J; LIU, N; et al., Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of CYP4T expression in crucian carp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 500-507, 2014.

MULLER, P. Y.; JANOVJAK, H.; MISEREZ, A. R.; et al. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. **BioTechniques**, v. 32, n. 6, p. 1-7, 2002.

NAJAFPANAH, M. J.; MOSTAFA SADEGHI, M.; BAKHTIARIZADEH, M. R. Reference Genes Selection for Quantitative Real-Time PCR Using RankAggreg Method in Different Tissues of *Capra hircus*. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.

NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; et al. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1 – 15, 2015.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, S/n. p. 7-19, 2010.

NICOT, N.; HAUSMAN, J. F.; HOFFMANN, L. et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n.421, p.2907–2914, 2005.

NINOV, K.; MOURÃO, G. B.; ANDREOTE, A. P. D. et al. Seleção de genes referência para RT-PCRq durante o desenvolvimento da musculatura esquelética de galinhas. In: **Congresso Brasileiro de Genética**, 55., 2009, Aguas de Lindóia. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. p.154.

OLIVEIRA, E.G. 2001. Pontos críticos no manejo e nutrição de codornas. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de aves e suínos e tecnologia da produção de rações. Campinas. **Anais...** Campinas, p.71-96.

OLIVEIRA, T. M dos S. PCR em Tempo real: métodos e aplicações. 2010. **Dissertação** – Universidade de Aveiro.

Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/7230>

Acesso em Outubro de 2015.

PAOLACCI, A. R.; TANZARELLA, O. A.; PORCEDDU, E. et al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 11, 2009.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. (2008). **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Springer, 332 p.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, 2001.

PFAFFL, M. W.; GRAHAM, W. H.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, V. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, S.N. p. 509–515, 2004.

RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 4, p. 856–862, 2004.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n. 1-2, p. 69–81, 2000.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. et al. Selection of housekeeping genes for genes expression studies in human reticulocytes using real time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, s/n, 2006.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. **Journal of Biotechnology**, n. 75, S/n, p. 291–295, 1999.

VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

VILELLA, J. L. **Criação de codornas**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998. 91p.

WEBER, R.; BERTONI, A. P. S.; BESSESTIL, L. W.; et al. Validation of Reference Genes for Normalization Gene Expression in Reverse Transcription Quantitative PCR in Human Normal Thyroid and Goiter Tissue. **BioMed Research International**, v. 2014, S/n, 2014.

WEINTRAUT, M. L.; KIM, S.; DALLOUL, R. A. et al. Expression of small intestinal nutrient transporters in embryonic and posthatch turkeys. **Poultry Science**, v. 95, n. 1, p. 90-98, 2015.

ZHANG, YU.; ZHANG, X.; LIU, X.; et al. Reference Gene Screening for Analyzing Gene Expression Across Goat Tissue. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 12, p. 1665 – 1671, 2013.

CAPÍTULO 1

Genes de referência para expressão gênica em codornas de corte

1.1. RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a estabilidade e recomendar genes de referência para PCR quantitativo em tempo real em diferentes tecidos de codornas de corte de ambos os sexos. Foram analisadas as estabilidades de 10 genes constitutivos (GAPDH, RPL5, MRPS27, MRPS30, TFRC, HMBS, EEF1, LDHA, B2M e UBC) em 4 tecidos (coração, coxa, cérebro e baço), de codornas machos e fêmeas, a partir dos programas Bestkeeper, NormFinder, GeNorm e método ΔCq para cada tecido. Os genes que se mostraram mais estáveis foram: MRPS30, EEF1 e HMBS no músculo da coxa; B2M, UBC e GAPDH no cérebro; MRPS30, TFRC e HMBS no coração; e EEF1, LDHA e HMBS no baço; sendo, portanto, recomendados para serem empregados como genes de referência em estudos de expressão gênica de codornas de corte machos e fêmeas.

Palavras-chave: Codorna europeia, gene endógeno, PCR em tempo real, estabilidade de expressão.

1.2. ABSTRACT

We aim with this study was to evaluate the stability and recommend reference genes for quantitative real-time PCR in different quails tissues of both sexes. The stability of 10 housekeeping genes (GAPDH, RPL5, MRPS27, MRPS30, TFRC, HMBS, EEF1, LDHA, B2M and UBC) was analyzed in four tissues (heart, thigh, brain and spleen) of males and females quails, by means of programs Bestkeeper, NormFinder, GeNorm and ΔCq method for each tissue. The most stable housekeeping genes were: MRPS30, EEF1 and HMBS in thigh muscle; B2M, GAPDH and UBC in brain; MRPS30, TFRC and HMBS in heart; and EEF1, LDHA and HMBS in spleen, It is therefore recommended to be used as reference genes for gene expression studies of male and female quails.

Keywords: European quail, endogenous gene, real-time PCR, expression of stability.

1.3. INTRODUÇÃO

Na avicultura industrial, a criação de codornas é um atividade que vem se destacando no Brasil. Codornas Europeias (*Coturnix coturnix coturnix*) também conhecidas como de corte, começaram a se desenvolver comercialmente e ganharam espaço em detrimento de codornas de postura devido à primeira ser considerada uma ave de fácil adaptação às condições de criação, precocidade na maturidade sexual, rápido crescimento, pequeno consumo de ração e grande resistência a enfermidades (MAKYIAMA, 2012). No entanto, sabe-se que o sucesso na produtividade depende não somente da otimização do sistema de produção com o desempenho animal isoladamente; outros fatores também são de extrema importância; como o genético, por exemplo. Os estudos de ordem gênica são capazes de fornecer informações intrínsecas que revelam particularidades do metabolismo animal, e estas, quando devidamente aplicadas, resultam em melhorias no aproveitamento e, conseqüente, desenvolvimento do sistema de produção.

Dentro do contexto genético, a análise de expressão gênica tem se fortalecido no meio científico, com constantes melhorias dos métodos e facilitação ao acesso de várias plataformas. Dentre esses métodos, a PCR em tempo real é bastante recorrente e uma das mais utilizadas nos estudos de expressão gênica. Por meio dessa técnica, uma sequência do genoma de interesse é amplificada bilhões de vezes, para a facilidade da análise, e aliada a um fluoróforo, a quantificação dessas cópias é feita em tempo real (LADEIRA et al., 2011). Os resultados obtidos por essa técnica necessitam de normalização por meio de um controle interno para, além de outras funções, a correção dos resultados que podem estar distorcidos pelas diferentes quantidades iniciais de ácido nucléico (APPLIED BIOSYSTEMS, 2015).

O controle interno é um gene ou um pequeno conjunto de genes, chamados genes de referência, que possuem expressão significativa no tecido que deve ser invariável em todas as condições experimentais, sendo que a escolha dos mesmos é bastante influente e decisiva nos resultados. Desse modo, a escolha dos genes de referência deve ser feita de forma minuciosa, com base em testes prévios que comprovem sua eficácia, pois várias condições fisiológicas e experimentais afetam os níveis de expressão.

Alguns trabalhos buscam encontrar respostas com relação ao comportamento gênico de animais em ambos os sexos. Para isso, é necessária a utilização de um mesmo

conjunto de genes de referência para normalizar os dados de expressão de ambas as amostras (machos e fêmeas) eliminando o efeito de sexo. No entanto, informações a respeito de genes utilizados como genes de referência são ainda escassas, para codornas principalmente, o que reforça a importância de experimentos que investiguem a ação dos mesmos, uma vez que estes são considerados a base da técnica e, por sua vez, influenciarão estudos genéticos posteriores relacionados à espécie.

Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar a estabilidade e recomendar genes de referência para PCR quantitativo em tempo real em diferentes tecidos de codornas de corte de ambos os sexos.

1.4. MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1. Coleta

Quatro tecidos (músculo da coxa, cérebro, coração e baço) foram coletados de seis codornas de corte (*Coturnix Coturnix coturnix*) aos 35 dias de idade, sendo três machos e três fêmeas (n=6). Esses animais foram obtidos de uma granja de produção comercial da cidade de São Cristóvão – SE onde, até os 35 dias, as codornas foram criadas sob condições padrão de manejo e a nutrição oferecida estava de acordo com as exigências de cada fase. Aos 35 dias os animais foram abatidos por deslocamento cervical, os tecidos foram coletados e armazenadas em tubos esterilizados contendo solução esterilizada RNAlater (Ambion, RNA Carlsbad, CA, USA). As amostras foram estocadas a 4°C por 12h e depois a -20°C até o momento da extração do RNA total.

1.4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 30 mg de cada tecido. A concentração de RNA foi determinada por meio do espectrofotômetro AstraGene UV/Vis (AstraNet Inc., Bath, UK) utilizando 2,5µl do RNA extraído. Para eliminação de eventuais contaminações das amostras, estas foram submetidas ao tratamento com DNase I *Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies) e a integridade do RNA foi avaliada por meio de gel de agarose 1% corado com o reagente *gel red™*, a 100V

por 30 min. Após essa verificação, o cDNA foi confeccionado a partir de 1 µg de RNA total de cada grupo utilizando o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo instruções do fabricante. As amostras de cDNA resultantes foram armazenadas a -20°C até a análise de PCR ser realizada.

1.4.3. PCR quantitativa em tempo real

Dez genes de referência foram selecionados para avaliação da estabilidade durante o estudo de expressão gênica em codornas machos e fêmeas. Os genes de referência foram escolhidos com base na literatura (NASCIMENTO et al., 2015), para a espécie *Gallus gallus*. O desenho dos *primers* ocorreu com a utilização do software *Primer Quest* fornecido pela empresa *DNA Technologies, Inc* (IDT, Coralville, IA, USA) e, após isso, para verificar a especificidade, as sequências foram analisadas no *Primer BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); os mesmos foram sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*. As informações e sequências de *primers* utilizados nesse estudo estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1: Genes de referência, *primers* específicos e parâmetros derivados da análise de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	ID do transcrito	Sequência do primer	Ta (°C)	Tf (pb)
<i>B2M</i>	Z48922	F: CCACCCAAGATCTCCATCAC R: CGTCCAGTCGTCGTTGAA	62	90
<i>EEF1</i>	NM_204157.2	F: GCCCGAAGTTCCTGAAATCT R: AACGACCCAGAGGAGGATAA	60	102
<i>GAPDH</i>	ENSGALE00000024703	F: CTGTAGCCCATATCTTGCCTTT R: CAAGACGATCTCCACTCTTCC	60	95
<i>HMBS</i>	ENSGALE00000001922	F: TGACCTGGTAGTTCACTCCTT R: TTGCAAATAGCACCAATGGTAAAG	60	72
<i>LDHA</i>	ENSGALE00000067556	F: CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R: GCAGCTCAGAGGATGGATG	60	124
<i>MRPS27</i>	XM_424803	F: GCTCCCAGCTCTATGGTTATG R: ATCACCTGCAAGGCTCTATTT	60	124
<i>MRPS30</i>	NM_204939.1	F: CCTGAATCCCAGGTTAACTATT R: GAGGTGCGGCTTATCATCTATC	60	107
<i>RPL5</i>	NM_204581.4	F: AATATAACGCCTGATGGGATGG R: CTTGACTTCTCTTTGGGTTTCT	60	99
<i>TFRC</i>	ENSGALE00000080099	F: CTCCTTTGAGGCTGGTGAG R: CGTTCCACACTTTATCCAAGAAG	60	89
<i>UBC</i>	M11100.1	F: CACCCTGTCTGACTACAACATC R: ACAAGACTGCTGACAACAACATA	62	92

ID do transcrito: número de acesso GenBank; Ta (°C): temperatura de anelamento; Tf (pb): tamanho do fragmento. (*B2M*: Microglobulina beta 2; *EEF1*: Fator de alongamento e tradução eucariótica 1; *GAPDH*: Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase; *HMBS*: Hidroximetilbilano sintase; *LDHA*: L-lactato desidrogenase A; *MRPS27*: Proteína ribossomal mitocondrial S27; *MRPS30*: Proteína ribossomal mitocondrial S30; *RPL5*: Proteína ribossomal L5; *TFRC*: Receptor de transferrina (p90, CD71); *UBC*: Ubiquitina C)

Todas as reações foram realizadas em termociclador CFX96 Real-Time PCR Detection System, usando como método de detecção *SYBR green* com *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega, Madison, WI, USA).

Para a realização dos testes de eficiência de cada *primer*, foi obtida uma amostra composta (*pool*), contendo uma amostragem geral dos diferentes perfis de RNA estudados. Esse *pool* foi então diluído para construir curvas padrão para otimização e cálculos de eficiência da PCR. Assim, quatro concentrações de cDNA (5, 15, 45 e 135 ng) e quatro concentrações de *primers* (200, 400, 800 e 1000 nM) foram testadas. As

condições experimentais da PCR foram as seguintes: um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60 segundos à 60-62°C. Um passo adicional com aumento gradual de temperatura foi acrescentado, com temperatura de 60-62°C para 95°C, para a obtenção da curva de dissociação.

A reação de amplificação foi realizada em diferentes poços e em duplicata e, cada par de primer teve sua especificidade conferida por meio do tamanho do *amplicon*, em eletroforese a 1,5% de gel de agarose. A eficiência de amplificação foi calculada para cada gene de referência utilizando a fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100 \text{ (PFAFFL, 2001)}.$$

Após a análise de eficiência, a temperatura de anelamento, concentração de cDNA e de *primer* mais adequadas foram usadas para realizar a reação de PCR. A reação ocorreu a um volume de 10 uL e os valores de Cq para os poços controle foram excluídos de análises posteriores, após serem exportados para o Excel, assim como os valores que se apresentaram superiores a 35 ou não detectados.

1.4.4. Estabilidade de expressão dos genes de referência

A estabilidade de expressão dos genes de referência foi analisada por meio de quatro métodos: Bestkeeper (PFAFFL et al., 2004), GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e método ΔC_t (SILVER et al., 2006), através do programa RefFinder (disponível no site <http://fulxie.0fees.us/?type=reference>), que integra os quatro algoritmos para comparar e classificar a estabilidade dos genes. Para o GeNorm e NormFinder, os valores usados para o cálculo são os da expressão relativa estimados a partir dos valores de Cq (min Cq – amostra Cq). Para o Bestkeeper e método ΔC_q os valores utilizados para fins de cálculo da estabilidade, são os próprios valores de Cq inseridos no RefFinder. Esta ferramenta analisa separadamente cada algoritmo utilizado e, fornece também uma classificação geral do melhor normalizador para a condição experimental testada, obtida através da combinação dos resultados dos quatro algoritmos.

1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1. Eficiência de amplificação e especificidade da reação

Os coeficientes de regressão (R^2) da curva padrão para os 10 genes de referência foram todos maiores que 0,99 e as eficiências de amplificação estiveram entre 94,75% e 106,00% indicando uma boa correlação linear e boa especificidade dos *primers* relativamente (Tabela 2).

TABELA 2: Características das reações de amplificação de PCR para os genes em estudo

Gene	Eficiência da PCR (%)	Slope	Coefficiente de regressão (R^2)
<i>B2M</i>	103,33	-3,29	0,993
<i>EEF1</i>	102,75	-3,25	0,990
<i>GAPDH</i>	94,75	-3,44	0,995
<i>HMBS</i>	96,00%	-3,41	0,995
<i>LDHA</i>	96,50%	-3,40	0,996
<i>MRPS27</i>	101,67%	-3,28	0,996
<i>MRPS30</i>	99,00%	-3,35	0,997
<i>RPL5</i>	99,00%	-3,34	0,997
<i>TFRC</i>	96,67%	-3,40	0,998
<i>UBC</i>	106,00%	-3,18	0,996

1.5.2. Expressão dos genes de referência

Observou-se alta variabilidade de expressão entre os genes. No músculo da coxa (Tabela 3), quatro genes foram altamente expressos (*GAPDH*, *RPL5*, *TFRC* e *EEF1*) uma vez que apresentaram valores de *Cq* entre 13 e 20. Os demais genes podem ser considerados de expressão moderada (*Cq* entre 21 e 28) (NASCIMENTO et al., 2015). Com relação à variância, os genes *MRPS30* (CV= 0,93%) e *B2M* (CV= 1,10%) mostraram baixa variância e dispersão; em contrapartida os genes *MRPS27* (CV= 3,50%) e *LDHA* (CV= 5,58%) obtiveram alta variância neste tecido. De acordo com os resultados de desvio padrão, para que o gene seja considerado estável no tecido, este valor deve estar situado abaixo de 1,0 (PFAFFL et al., 2004), sendo assim, todos os genes foram estáveis para o músculo da coxa, com exceção do *LDHA* (DP = 1,35) que apresenta desvio padrão superior a 1,0.

TABELA 3: Estatística descritiva e níveis de expressão dos genes de referência de codornas de corte aos 35 dias testados em quatro tecidos (coxa, cérebro, coração e baço) de codornas, obtidos no bestkeeper (n= 6)

Gene	Med. Geo. (Cq)	Med. Ar. (Cq)	Min. (Cq)	Max. (Cq)	DP (\pm Cq)	CV (% Cq)
COXA						
<i>GAPDH</i>	17,11	17,12	16,43	17,82	0,50	2,94
<i>RPL5</i>	16,38	16,39	15,86	17,02	0,38	2,34
<i>MRPS27</i>	28,39	28,41	27,28	29,56	0,99	3,50
<i>MRPS30</i>	23,62	23,62	23,28	23,90	0,22	0,93
<i>TFRC</i>	16,53	16,54	15,82	17,11	0,45	2,71
<i>HMBS</i>	23,17	23,18	22,45	23,59	0,33	1,43
<i>EEF1</i>	16,74	16,75	16,24	17,09	0,24	1,41
<i>LDHA</i>	24,10	24,16	22,42	27,84	1,35	5,58
<i>B2M</i>	26,27	26,27	25,76	26,70	0,29	1,10
CÉREBRO						
<i>GAPDH</i>	16,00	16,01	15,47	16,62	0,44	2,73
<i>RPL5</i>	22,42	22,46	20,28	24,64	1,28	5,69
<i>TFRC</i>	16,68	16,71	15,62	17,80	0,79	4,71
<i>HMBS</i>	27,62	27,64	26,27	29,13	1,01	3,64
<i>EEF1</i>	18,04	18,05	17,11	18,66	0,52	2,90
<i>LDHA</i>	24,00	24,01	22,88	24,84	0,61	2,54
<i>B2M</i>	26,94	26,94	26,26	27,72	0,37	1,38
<i>UBC</i>	29,27	29,27	28,70	29,86	0,38	1,30
CORAÇÃO						
<i>GAPDH</i>	19,21	19,22	18,58	19,89	0,52	2,70
<i>RPL5</i>	26,16	26,18	24,19	27,57	0,95	3,62
<i>MRPS27</i>	22,99	23,00	22,20	23,75	0,57	2,48
<i>MRPS30</i>	25,46	25,46	25,17	25,73	0,17	0,67
<i>TFRC</i>	26,31	26,31	26,14	26,50	0,13	0,49
<i>HMBS</i>	27,71	27,72	27,31	28,20	0,38	1,38
<i>EEF1</i>	20,09	20,46	16,47	24,50	3,87	18,91
<i>LDHA</i>	25,72	25,73	24,69	26,55	0,53	2,05
<i>B2M</i>	22,64	22,66	21,35	23,93	0,97	4,29
BAÇO						
<i>GAPDH</i>	18,03	18,11	15,90	20,22	1,64	9,06
<i>RPL5</i>	26,78	26,79	25,31	28,09	0,70	2,62
<i>MRPS27</i>	25,49	25,50	25,26	25,85	0,18	0,69
<i>MRPS30</i>	25,24	25,28	23,79	26,89	1,35	5,33
<i>HMBS</i>	27,08	27,08	26,53	27,73	0,41	1,52
<i>EEF1</i>	24,86	24,87	24,29	25,62	0,39	1,58
<i>LDHA</i>	25,63	25,64	24,99	26,35	0,47	1,85

Cq: ciclo de quantificação, Med geo.: média geométrica de Cq; Med ar.: média aritmética de Cq; min e max Cq: valor mínimo e máximo de Cq; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

As expressões gênicas também foram variáveis para o cérebro (Tabela 3). Dos oito genes avaliados para este tecido, três genes (*GAPDH*, *TFRC* e *EEF1*) foram altamente expressos, com os mais baixos valores de Cq. O gene *UBC* foi o menos expresso ($Cq \geq 28$) dentre todos os outros. Os genes *LDHA*, *B2M* e *UBC*, por apresentarem coeficientes de variação até 2,5% foram considerados de baixa dispersão no cérebro de codornas. E, considerando o desvio padrão, somente o gene *RPL5* ($DP =$

1,28) se mostrou não estável. Dos nove genes avaliados no coração, pode-se observar (Tabela 3) que quase todos os genes avaliados apresentaram expressão moderada, com valores de Cq de 21 a 28. No entanto, as variabilidades de expressão neste tecido, se mostraram bastante heterogêneas, onde o gene que apresentou menor dispersão foi o TFRC (CV= 0,49%) e o gene EEF1 (CV= 18,91%) foi o mais variável, possuindo também alto desvio padrão (DP= 3,87). Descarta-se a possibilidade de erro técnico para o gene EEF1, uma vez que os valores de Cq das replicatas foram homogêneos intra grupos (macho/fêmea) (ANEXO A).

No baço, dos sete genes que foram avaliados, todos apresentaram expressão moderada, com exceção do gene GAPDH, que obteve Cq = 18,03 (Tabela 3) e pode ser considerado de alta expressão. No entanto, apesar da expressão, o GAPDH mostrou-se bastante disperso, e portanto não estável (CV = 9,06% e DP = 1,64) no tecido. Assim como o gene EEF1 avaliado no coração, os valores de Cq das replicatas para o gene GAPDH foram homogêneos intra grupos (macho/fêmea), descartando eventuais erros técnicos.

1.5.3. Estabilidade de expressão dos genes de referência

A ferramenta RefFinder forneceu uma classificação com base em quatro métodos (BestKeeper, NormFinder, GeNorm e método ΔCq) comumente utilizados para esse fim; e para cada método e gene, uma classificação foi indicada. A ferramenta online também fornece uma classificação média para os genes de acordo com a estabilidade de todos os programas testados.

Na Tabela 4 estão apresentadas as estabilidades de expressão dos genes de referência avaliados nos quatro tecidos (coxa, cérebro, coração e baço) de codornas de corte.

TABELA 4: Valores de estabilidade, classificação por algoritmo e geral para os genes de referência nos quatro tecidos avaliados em codornas de corte

Gene	BestKeeper	GeNorm	NormFinder	ΔCq	Classificação geral
COXA					
<i>GAPDH</i>	0,503	0,481	1,978	0,850	6
<i>RPL5</i>	0,383	0,310 (2)	0,433	0,810	5
<i>MRPS27</i>	0,993	0,727	1,389	1,500	8
<i>MRPS30</i>	0,220 (1)	0,228 (1)	0,189 (2)	0,730 (1)	1
<i>TFRC</i>	0,449	0,531	0,402	0,890	7
<i>HMBS</i>	0,331	0,228 (1)	0,298 (3)	0,780 (3)	3
<i>EEF1</i>	0,237 (2)	0,399 (3)	0,136 (1)	0,750 (2)	2
<i>LDHA</i>	1,348	1,017	1,978	2,030	9
<i>B2M</i>	0,290 (3)	0,424	0,377	0,810	4
CÉREBRO					
<i>GAPDH</i>	0,437 (3)	0,247 (1)	0,648 (3)	1,040 (3)	3
<i>RPL5</i>	1,278	1,210	1,555	1,750	8
<i>TFRC</i>	0,787	0,366 (2)	1,169	1,330	6
<i>HMBS</i>	1,005	1,031	1,218	1,410	7
<i>EEF1</i>	0,523	0,247 (1)	0,799	1,100	4
<i>LDHA</i>	0,610	0,901	0,708	1,100	5
<i>B2M</i>	0,371 (1)	0,718 (3)	0,240 (1)	0,970 (2)	1
<i>UBC</i>	0,381 (2)	0,822	0,370 (2)	0,970 (1)	2
CORAÇÃO					
<i>GAPDH</i>	0,518	0,492 (3)	0,804	1,280 (3)	4
<i>RPL5</i>	0,948	0,949	1,037	1,770	8
<i>MRPS27</i>	0,570	0,548	0,918	1,360	6
<i>MRPS30</i>	0,170 (2)	0,258 (1)	0,074 (1)	1,190 (1)	1
<i>TFRC</i>	0,130 (1)	0,258 (1)	0,129 (2)	1,200 (2)	2
<i>HMBS</i>	0,383 (3)	0,423 (2)	0,240 (3)	1,200 (2)	3
<i>EEF1</i>	3,870	1,729	4,425	4,460	9
<i>LDHA</i>	0,528	0,785	0,295	1,420	5
<i>B2M</i>	0,973	0,670	1,476	1,680	7
BAÇO					
<i>GAPDH</i>	1,640	1,019	1,873	1,965	6
<i>RPL5</i>	0,702	0,678	0,862	1,286	5
<i>MRPS27</i>	0,177 (1)	0,518 (3)	0,270	1,011	4
<i>MRPS30</i>	1,348	1,324	2,001	2,085	7
<i>HMBS</i>	0,412 (3)	0,461 (2)	0,237 (3)	0,959 (2)	3
<i>EEF1</i>	0,393 (2)	0,335 (1)	0,168 (2)	0,958 (1)	1
<i>LDHA</i>	0,473	0,335 (1)	0,168 (1)	1,001 (3)	2

O algoritmo BestKeeper fornece os valores de desvio padrão e coeficiente de variação para os genes testados, onde genes que apresentam desvio padrão maior que

1,0 são considerados instáveis e devem ser excluídos da análise (PFAFFL et al., 2004). Assim, o gene que apresentar menor desvio padrão é o primeiro na classificação de estabilidade. No GeNorm as classificações se baseiam no valor de estabilidade de expressão média (M), que podem chegar ao limite de 1,5 para serem considerados estáveis (VANDESOMPELE et al., 2002). Dessa forma, o menor valor de “M”, significa maior estabilidade para o gene em questão. O NormFinder por sua vez, se baseia na variância entre amostras, onde o menor valor indica uma menor variação e, conseqüentemente, maior estabilidade (ANDERSEN et al., 2004). O método ΔCq , pode ser considerado o mais rígido por testar o gene através da comparação de sua expressão com todos os demais genes, par a par. Após obter um desvio padrão de cada comparação, ele fornece a média do desvio para cada gene. Então, se o valor de ΔCq entre os pares de genes permanecer constante para todas as amostras testadas, menor será o desvio e, conseqüentemente, maior a estabilidade de sua expressão (SILVER et al., 2006).

Para obter a classificação geral final, o RefFinder se baseia nos rankings dos genes mais ou menos estáveis obtidos por cada um dos programas, atribui um peso adequado a um gene individual e calcula a média geométrica dos seus pesos. Dessa forma, uma média entre os valores de estabilidade fornecido por cada programa pode ser obtida, o que torna mais fácil a análise e percepção da estabilidade dos genes para os diferentes tecidos em estudo. Com base nessa classificação, os genes MRPS30, EEF1 e HMBS foram os que apresentaram expressão mais estável no músculo da coxa; B2M, UBC e GAPDH foram os genes mais estáveis no cérebro, MRPS30 e TFRC seguidos pelo gene HMBS mostraram ser os mais estáveis no coração; e, os genes EEF1, LDHA e HMBS foram os mais estáveis no baço de codornas.

O gene MRPS30 é uma proteína ribossomal mitocondrial codificada por genes nucleares, com elevada atividade em tecidos musculares e, a síntese de proteínas dentro da mitocôndria é auxiliada por este gene. Além disso, os ribossomos dos quais o gene em questão fazem parte, consistem em 75% das proteínas para composição de rRNA e, sendo assim, estão em abundância nas células e sua expressão é considerada contínua (<http://www.genecards.org>). Por essa razão, acredita-se que tais genes se mostraram estáveis neste estudo, por serem requeridos continuamente nas células fazendo parte de processos indispensáveis à manutenção das mesmas.

O gene EEF1 codifica uma proteína responsável pelo fator de alongação alfa-1 que é responsável pela entrega enzimática do tRNAs aminoacil para o ribossomo

durante a síntese de proteínas. Este também é uma isoforma do complexo FES-1 subunidade alfa, GTPase, e está envolvido com a proteína actina, na proteólise (HAMRITA et al., 2011; BECKER et al., 2013), o que pode explicar sua maior expressão e estabilidade no tecido da coxa.

O gene B2M, por sua vez, codifica uma proteína de soro encontrado em associação com o maior complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I de cadeia pesada na superfície de células quase todas nucleadas (<http://www.genecards.org>). No cérebro, ocorre também a atuação da ubiquitina (UBC), sendo esta necessária na criação adequada, manutenção e desmontagem de subdomínios de proteínas dentro do neurônio e sua função é predominante durante toda a vida desta célula nervosa (YI e EHLERS, 2007). Assim, todos os genes indicados como mais estáveis nos quatro tecidos avaliados, atuam em grande escala no metabolismo de sobrevivência da célula, com relativamente pouca participação em rotas exclusivas de apenas um dos sexos; sendo, por esta razão recomendados para a normalização da expressão gênica de codornas machos e fêmeas.

Percebe-se que o gene HMBS foi um dos mais estáveis para três dos tecidos avaliados (coxa, coração e baço). Alguns trabalhos que avaliaram a estabilidade do gene HMBS, encontrou esse gene como sendo um dos mais estáveis quando se considera vários tecidos em uma mesma análise. Zhang et al. (2013), por exemplo, avaliando a estabilidade de oito genes de referência em 10 tipos de tecidos de cabras Boer, constataram que o gene HMBS foi o terceiro mais estável e, portanto, recomendado para calibrar análises de expressão gênica de tecidos de cabras desta raça, por meio de PCR quantitativo em tempo real. Em tecido muscular, o gene HMBS foi também constatado ser o mais estável por Nascimento et al. (2015), no músculo *Pectoralis major* de frangos.

Neste estudo, pode-se constatar que alguns genes (MRPS27 na coxa; RPL5 e TFRC no cérebro, EEF1 no coração e GAPDH no baço) foram considerados pouco estáveis e, por isso, não recomendados como genes de referência quando se pretende analisar a expressão gênica de codornas de ambos os sexos. No entanto, pelos altos coeficientes de variação e desvio apresentados por esses genes, poderia ser constatado um efeito de sexo, fazendo com que os mesmos possam ser recomendados como genes de referência quando se tem em análise somente um dos sexos. Nas Figuras 1 à 4, é possível observar essa variação na estabilidade.

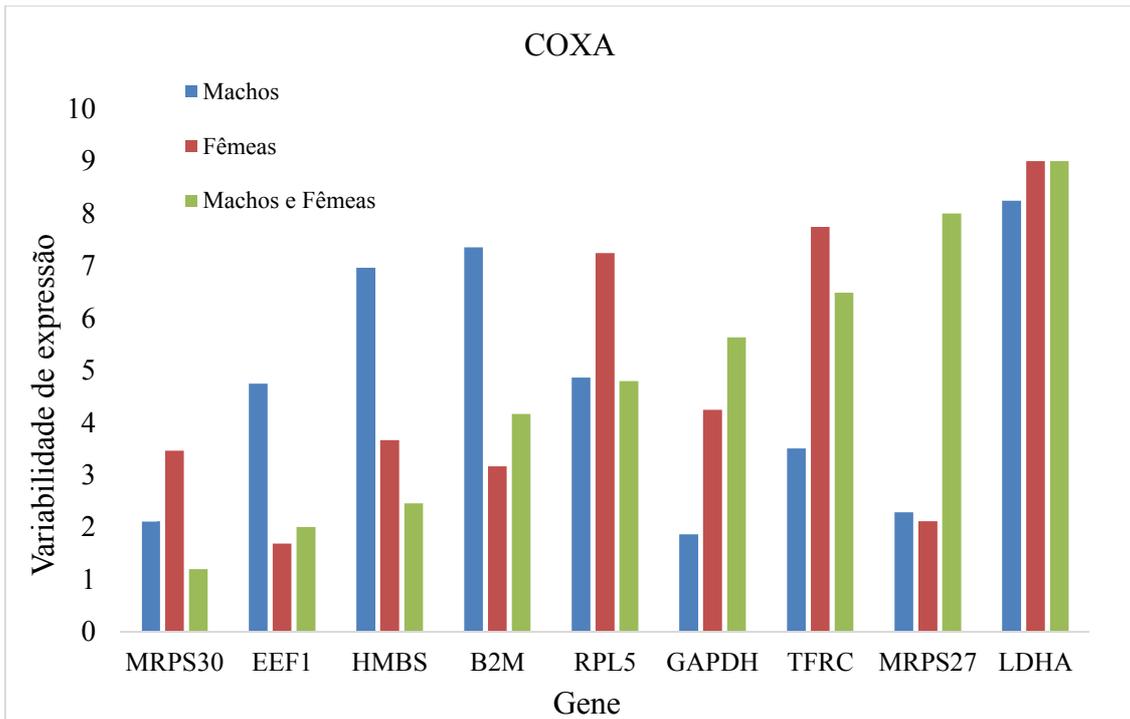


FIGURA 1: Variabilidade de expressão dos genes de referência no músculo da coxa de codornas, dentro e entre grupos.

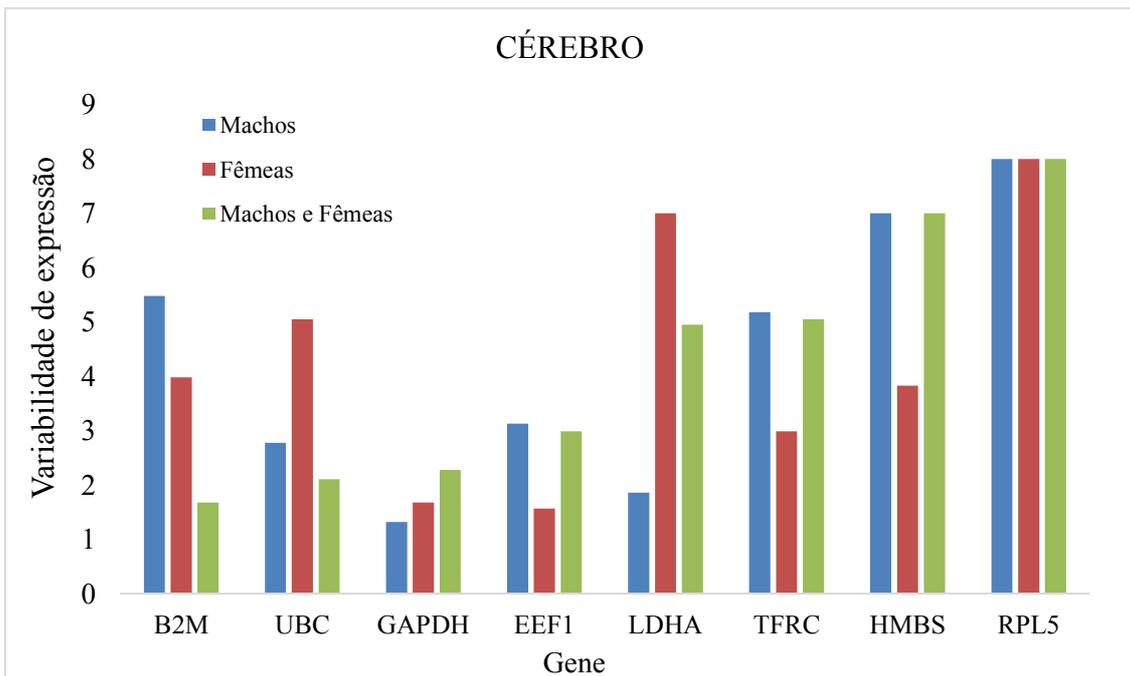


FIGURA 2: Variabilidade de expressão dos genes de referência no cérebro de codornas, dentro e entre grupos

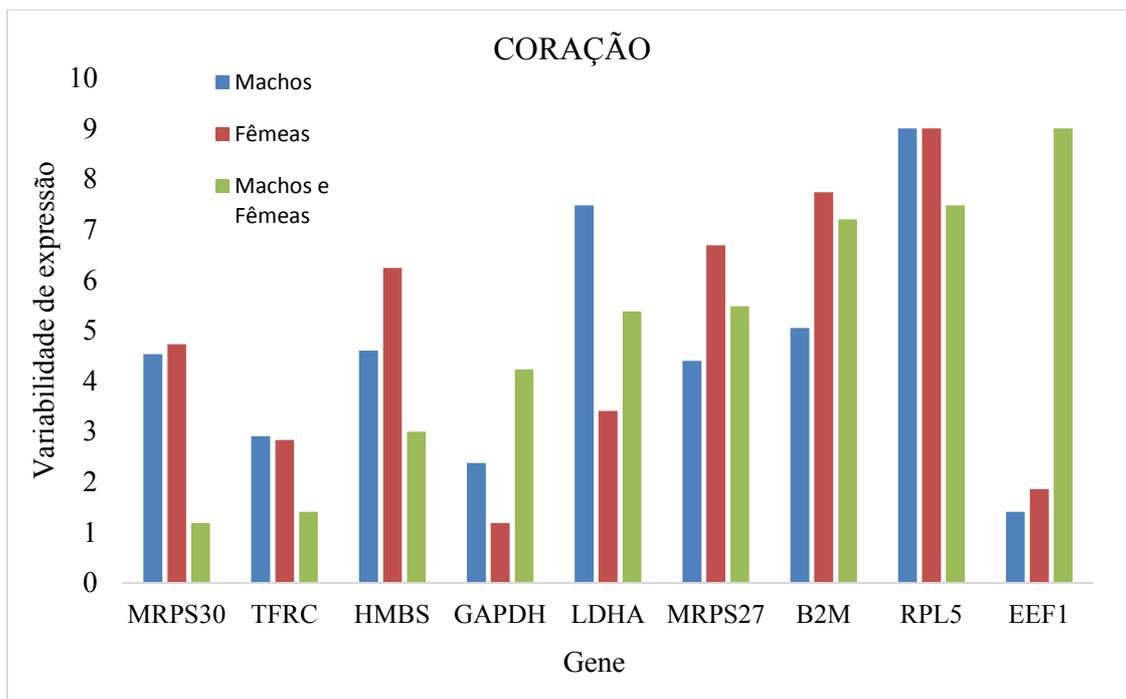


FIGURA 3: Variabilidade de expressão dos genes de referência no coração de codornas, dentro e entre grupos

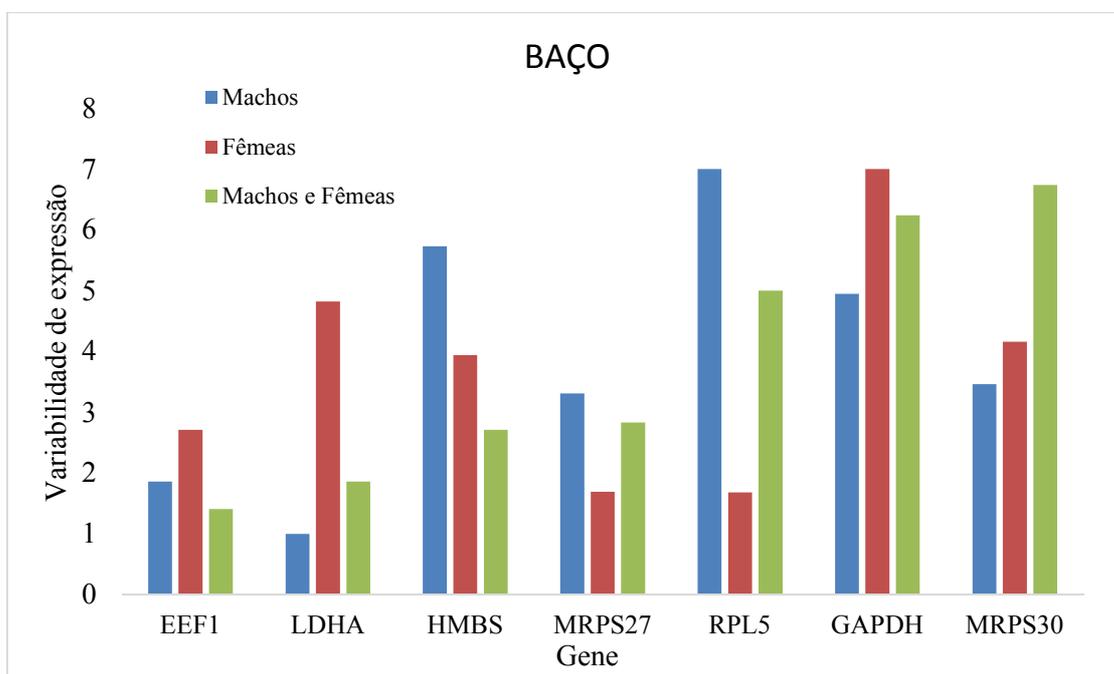


FIGURA 4: Variabilidade de expressão dos genes de referência no baço de codornas, dentro e entre grupos

Esses resultados foram capazes de apontar genes estáveis para serem utilizados em estudos de expressão gênica, em que seja necessário avaliar ambos os sexos de

codornas e em diferentes tecidos. As diferenças encontradas para cada tecido evidencia que o tecido é um importante fator de variabilidade e deve ser levado em consideração no processo experimental. Para alguns genes analisados, o efeito de sexo pode ser notado, sugerindo-se portanto que estudos futuros possam comprovar a estabilidade de expressão e recomendar genes adequados à normalização para cada sexo isoladamente.

Estudos que avaliam o comportamento genético em animais sem distinção de sexo são de extrema importância e devem ser alvo de aprimoramentos constantes. Devido à escassez de trabalhos referentes a genética molecular em codornas, o presente estudo serve como base informativa para dar continuidade a pesquisas de expressão gênica nesta mesma espécie, além de servir também como base para investigações em animais da mesma família, como frangos e perdizes, por exemplo, podendo impulsionar, conseqüentemente, toda a cadeia produtiva.

1.6. Conclusão

De acordo com a classificação apontada pela ferramenta refFinder, com base nos quatro algoritmos avaliados (BestKeeper, GeNorm, NormFinder e ΔCq), os genes MRPS30, EEF1 e HMBS no músculo da coxa; B2M, UBC e GAPDH no cérebro; MRPS30, TFRC e HMBS no coração; e, EEF1, LDHA e HMBS no baço; são os mais estáveis sendo, portanto, recomendados para serem empregados como controle endógeno em estudos de expressão gênica de codornas de corte machos e fêmeas.

1.7. REFERÊNCIAS

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**, v. 64, s/n. p. 5245–5250, 2004.

BECKER, M.; KUHSE, J.; KIRSCH, J.; Effects of two elongation factor 1A isoforms on the formation of gephyrin clusters at inhibitory synapses in hippocampal neurons. **Histochemistry and Cell Biology**, v.140, n.6, p. 603 – 609, 2013.

GONZALES, E.;SARTORI, J. R. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangosde corte**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2002. p.279-298.

GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; et al. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.305, n. 3, p. 709-718, 2003.

HAMRITA, B.; NASR, H. B.; HAMMANN, et al. An elongation factor-like protein (EF-Tu) elicits a humoral response in infiltrating ductal breast carcinomas: an immunoproteomics investigation. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n.13, p. 1097–1104, 2011.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista Medicina**, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.

MADEIRA, L. A. Morfologia das fibras musculares esqueléticas de frangos de corte criados nos sistemas confinado e semi-confinado. 2005. 64p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; et al. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1 – 15, 2015.

OLIVEIRA, E.G. 2001. Pontos críticos no manejo e nutrição de codornas. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de aves e suínos e tecnologia da produção de rações. Campinas. **Anais...** Campinas, p.71-96.

PFAFFL, M. W.; A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, 2001.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, S.N. p. 509–515, 2004.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. et al. Selection of housekeeping genes for genes expression studies in human reticulocytes using real time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, s/n, 2006.

TARZE, A.; DENIAUD, A.; BRAS, M. Le. et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, v.26, s/n, p. 2606-2620, 2007.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F. et al. Accurate Normalization of real-time Quantitative RT-PCR data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. **Genome Biology**, London, v. 18 S. N. p. 3-7, 2002.

YI, J. J.; EHLERS, M. D.; Emerging Roles for Ubiquitin and Protein Degradation in Neuronal Function. **Pharmacological reviews**, v. 59, n. 1, p. 14 – 39, 2007.

ZHANG, YU.; ZHANG, X.; LIU, X.; et al. Reference Gene Screening for Analyzing Gene Expression Across Goat Tissue. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 12, p. 1665 – 1671, 2013.

ANEXOS

ANEXO A

1A. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *GAPDH* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	16,19	15,33	19,68	15,78
1	Macho	16,67	15,61	19,60	16,02
2	Macho	16,85	15,64	20,11	16,80
2	Macho	16,20	15,32	19,68	16,55
3	Macho	16,88	15,69	19,98	16,73
3	Macho	16,94	15,84	19,36	16,94
4	Fêmea	17,24	16,01	19,07	19,32
4	Fêmea	17,65	16,79	18,65	19,49
5	Fêmea	17,43	16,81	18,48	19,56
5	Fêmea	17,80	16,44	18,69	20,89
6	Fêmea	17,79	16,05	18,71	19,36
6	Fêmea	17,84	16,59	18,59	19,88

ANEXO B

1B. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *RPL5* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	15,65	21,33	24,16	27,75
1	Macho	16,63	21,36	24,22	28,43
2	Macho	16,36	23,08	25,79	27,16
2	Macho	15,94	23,19	25,83	25,60
3	Macho	17,40	24,46	27,52	25,19
3	Macho	16,42	24,82	27,63	25,43
4	Fêmea	16,50	20,04	27,35	27,65
4	Fêmea	16,01	20,53	25,27	27,05
5	Fêmea	16,99	21,92	28,98	27,25
5	Fêmea	17,04	21,95	26,03	26,83
6	Fêmea	16,00	23,23	26,26	26,33
6	Fêmea	15,72	23,68	25,13	26,83

ANEXO C

1C. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *MRPS27* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	29,62	---	23,75	25,38
1	Macho	29,5	---	23,58	25,44
2	Macho	29,06	---	23,44	25,81
2	Macho	29,35	---	23,12	25,89
3	Macho	29,22	---	23,72	25,24
3	Macho	29,66	---	23,78	25,61
4	Fêmea	27,45	---	22,14	25,85
4	Fêmea	27,53	---	22,25	25,48
5	Fêmea	27,94	---	22,73	25,50
5	Fêmea	27,01	---	22,86	25,20
6	Fêmea	27,26	---	22,27	25,30
6	Fêmea	27,30	---	22,28	25,21

---: tecido não utilizado na avaliação do gene.

ANEXO D

1D. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *MRPS30* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	23,61	---	25,58	26,04
1	Macho	23,84	---	25,74	26,47
2	Macho	23,54	---	25,55	26,90
2	Macho	23,06	---	25,91	26,56
3	Macho	23,97	---	25,48	26,86
3	Macho	23,82	---	25,26	26,91
4	Fêmea	23,75	---	25,21	23,67
4	Fêmea	23,68	---	25,47	23,95
5	Fêmea	23,72	---	25,01	24,01
5	Fêmea	23,85	---	25,33	24,37
6	Fêmea	23,31	---	25,37	23,72
6	Fêmea	23,25	---	25,65	23,85

---: tecido não utilizado na avaliação do gene

ANEXO E

1E. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *TFRC* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	16,59	15,90	26,86	---
1	Macho	16,78	15,33	25,97	---
2	Macho	16,02	15,61	25,65	---
2	Macho	15,80	15,64	26,63	---
3	Macho	16,55	16,32	26,36	---
3	Macho	16,73	16,69	25,94	---
4	Fêmea	15,94	17,84	26,40	---
4	Fêmea	15,70	17,01	26,42	---
5	Fêmea	17,94	17,79	26,50	---
5	Fêmea	16,17	17,81	26,01	---
6	Fêmea	17,18	17,44	26,99	---
6	Fêmea	17,04	17,05	26,00	---

---: tecido não utilizado na avaliação do gene

ANEXO F

1F. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *HMBS* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	23,23	29,49	27,35	27,25
1	Macho	23,12	28,56	27,27	27,65
2	Macho	22,58	28,89	27,98	26,83
2	Macho	22,32	29,36	28,03	26,33
3	Macho	23,42	28,88	28,26	26,83
3	Macho	23,75	26,67	28,13	26,22
4	Fêmea	23,58	26,41	27,75	27,61
4	Fêmea	23,44	26,13	28,43	27,84
5	Fêmea	23,12	26,94	27,16	27,54
5	Fêmea	23,72	26,91	27,60	27,06
6	Fêmea	22,78	26,87	27,19	26,97
6	Fêmea	23,03	26,55	27,43	26,82

ANEXO G

1G. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *EEF1* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	16,28	17,94	16,84	24,72
1	Macho	16,19	17,17	16,53	23,85
2	Macho	16,67	17,18	16,87	24,20
2	Macho	16,85	17,04	16,07	24,80
3	Macho	16,20	17,86	16,33	24,73
3	Macho	16,88	17,97	16,90	24,66
4	Fêmea	16,94	18,71	24,47	25,71
4	Fêmea	17,24	18,39	24,53	25,52
5	Fêmea	17,65	18,47	24,67	25,10
5	Fêmea	16,43	18,56	23,95	25,47
6	Fêmea	16,80	18,77	24,01	24,93
6	Fêmea	16,79	18,54	24,37	24,64

ANEXO H

1H. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *LDHA* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	22,32	24,62	25,22	25,48
1	Macho	22,52	24,71	25,45	24,50
2	Macho	23,08	24,77	24,94	25,20
2	Macho	22,99	24,90	24,44	25,30
3	Macho	23,66	24,51	25,58	25,45
3	Macho	23,83	24,20	25,55	25,05
4	Fêmea	24,79	23,94	26,61	26,86
4	Fêmea	24,26	23,63	26,48	25,83
5	Fêmea	23,27	23,49	26,21	26,00
5	Fêmea	23,52	23,58	26,01	25,54
6	Fêmea	29,62	22,71	26,37	25,46
6	Fêmea	26,06	23,05	25,85	26,95

ANEXO I

II. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *B2M* avaliado nos tecidos de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Coxa (Cq)	Cérebro (Cq)	Coração (Cq)	Baço (Cq)
1	Macho	26,10	27,75	23,41	---
1	Macho	25,99	27,68	23,13	---
2	Macho	26,16	26,72	23,94	---
2	Macho	26,62	26,85	23,91	---
3	Macho	25,66	27,31	23,87	---
3	Macho	25,86	27,25	23,55	---
4	Fêmea	26,85	26,04	22,47	---
4	Fêmea	26,55	26,47	22,23	---
5	Fêmea	26,62	26,90	21,12	---
5	Fêmea	26,57	26,56	21,58	---
6	Fêmea	25,98	26,86	21,32	---
6	Fêmea	26,3	26,91	21,42	---

---: tecido não utilizado na avaliação do gene

ANEXO J

IIJ. Valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos da reação de amplificação na PCR quantitativa em tempo real, para o gene de referência *UBC* avaliado no cérebro de codornas de corte.

Replicata	Sexo	Cérebro (Cq)
1	Macho	29,60
1	Macho	30,11
2	Macho	29,68
2	Macho	29,98
3	Macho	29,36
3	Macho	29,07
4	Fêmea	29,65
4	Fêmea	28,48
5	Fêmea	28,69
5	Fêmea	28,71
6	Fêmea	28,59
6	Fêmea	29,32