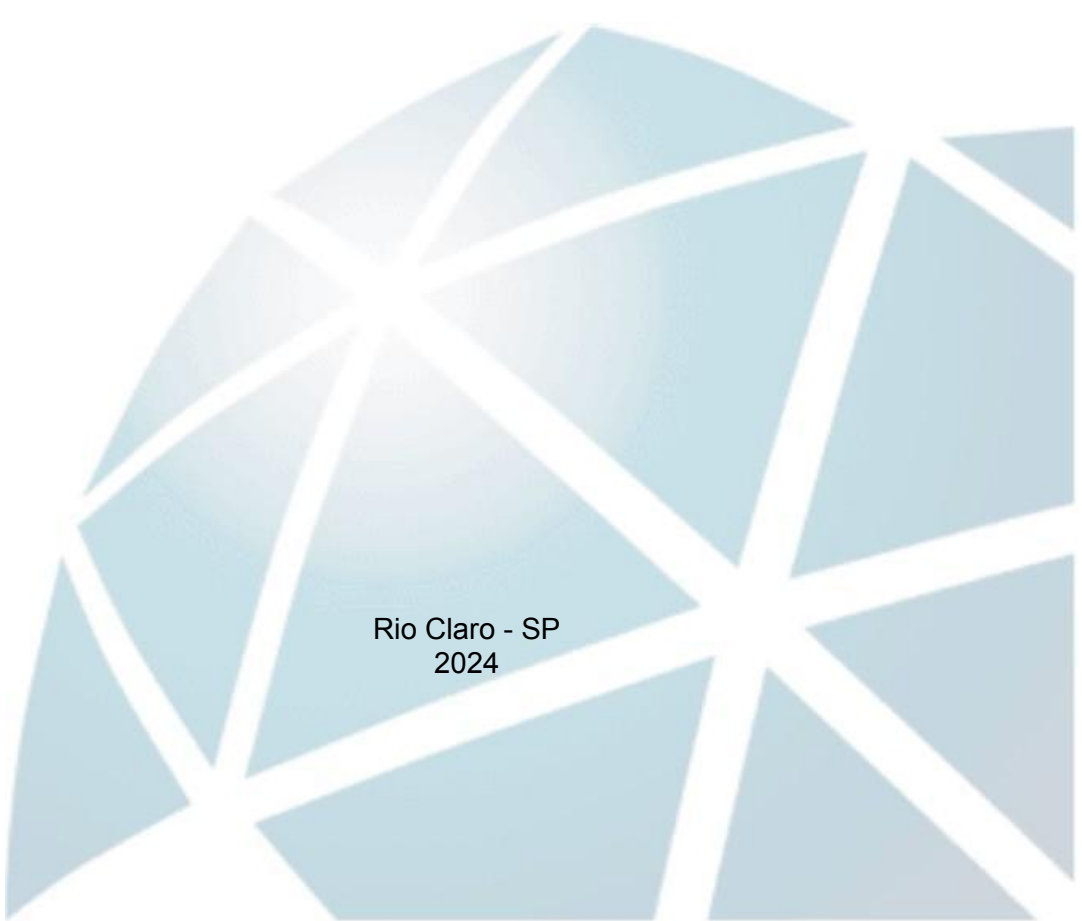

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELE SCHINCARIOL CARCIOFI

**ANÁLISE DE REDES REGULATÓRIAS DE
GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE AVES
DE CORTE E POSTURA**



Rio Claro - SP
2024

GABRIELE SCHINCARIOL CARCIOFI

**ANÁLISE DE REDES REGULATÓRIAS DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DE AVES DE CORTE E POSTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúcia Elvira Álvares

Coorientadora: Prof^a Dr^a Milene Ferro

Supervisora: Prof^a Dr^a Milene Ferro

Rio Claro - SP
2024

S336a Schincariol Carciofi, Gabriele
Análise de redes regulatórias de genes
diferencialmente expressos no desenvolvimento
embrionário de aves de corte e postura / Gabriele
Schincariol Carciofi. -- Rio Claro, 2024
24 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lúcia Elvira Álvares
Coorientadora: Milene Ferro

1. Genética. 2. Genética do desenvolvimento. 3.
Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Regulação da expressão gênica. I. Título.
Dados fornecidos pelo autor(a).

GABRIELE SCHINCARIOL CARCIOFI

**ANÁLISE DE REDES REGULATÓRIAS DE
GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE AVES
DE CORTE E POSTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Lúcia Elvira Alvares

Profª Drª Karen Cristiane Martinez de Moraes

Profª Drª Patrícia Pasquali Parise Maltempi

Aprovado em: 11 de Novembro de 2024

Assinatura da orientadora

Assinatura da coorientadora

Assinatura da discente



Documento assinado digitalmente

GABRIELE SCHINCARIOL CARCIOFI

Data: 02/12/2024 22:27:25-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Lúcia Elvira Alvares. Sem ela, nada disso seria possível. Ela sempre foi muito atenciosa e paciente durante todo o processo. Desde as primeiras reuniões, estive ao meu lado para esclarecer dúvidas e orientar com uma elegância inigualável. Me ensinou muito sobre ser cientista e me inspirou com sua transparência, atenção aos detalhes e profundo respeito. Corrigiu-me sempre que necessário e me proporcionou um aprendizado muito mais rico do que eu poderia imaginar. Sua didática, comprometimento e paciência, além da confiança que depositou em mim para explorar um tema pelo qual eu tinha muita curiosidade, mas pouca experiência, foram essenciais. Esse processo teve momentos difíceis, mas minha orientadora sempre os transformou em aulas memoráveis. Também agradeço à Dr^a Renata Erbert Contriciani, que gentilmente disponibilizou as tabelas de DEGs, as imagens do MetaCore e Cytoscape, e com quem tive a oportunidade de conversar brevemente. Espero poder colaborar com ela em trabalhos futuros.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, mesmo que não tenha sido possível um contato mais próximo devido à distância, agradeço pela colaboração e pelas conversas ao longo do ano, que foram inestimáveis na minha jornada. Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e à Universidade Estadual de Campinas. À minha coorientadora e supervisora, Prof^a Dr^a Milene Ferro, e à Prof^a Dr^a Aline Silva Cesar Mello, por me ajudarem a compreender melhor a bioestatística e abrir um vasto leque de possibilidades para meus estudos futuros. Aos membros da banca avaliadora, estendo minha gratidão por disponibilizarem seu tempo e conhecimento para avaliar este trabalho.

Por fim, quero expressar minha sincera gratidão aos meus pais, à minha avó e aos amigos pelo apoio emocional. Vocês foram meu porto seguro nos momentos mais desafiadores e me encorajaram constantemente. Sou grata pela paciência, compreensão, atenção e carinho de cada um.

RESUMO

Neste trabalho foi analisado um conjunto de genes diferencialmente expressos (DEGs) relacionados ao processo biológico de "Desenvolvimento" obtidos a partir do transcriptoma global da asa e região peitoral de embriões nos estágios do desenvolvimento HH17, HH19 e HH21 (2,5 a 3,0 dias de desenvolvimento) desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves de Concórdia - SC e obtidos do trabalho de Contriciani *et al.* (2024). Esses genes foram identificados como *up-regulated* (682) e *down-regulated* (498) no transcriptoma de frangos de corte em relação às galinhas de postura. O objetivo deste trabalho foi identificar os principais reguladores e vias de sinalização molecular associadas aos DEGs do processo "Desenvolvimento". Para isso foi utilizado o banco de dados MetaCore™, para realizar as análises de enriquecimento funcional e criar as redes de regulação dos principais genes reguladores dos DEGs que são *up* ou *down-regulated* na linhagem de corte (TT) em relação à linhagem de postura (CC). Em seguida, foram construídas sub-redes empregando um filtro, no qual foram selecionados apenas os DEGs que codificam fatores de transcrição, receptores e ligantes para avaliar sua interação com reguladores transcricionais no Cytoscape. Por fim, uma rede de interação proteína-proteína foi construída pelo STRING, destacando as proteínas que fazem parte da via de sinalização TGF- β entre os DEGs *up-regulated*. Os principais resultados indicaram que o fator de transcrição KLF4 e a via de sinalização TGF- β desempenham papéis importantes na regulação de genes associados ao crescimento acelerado das aves de corte.

Palavras-chave: KLF4; embrião de galinha; desenvolvimento.

ABSTRACT

In this study, a set of differentially expressed genes (DEGs) related to the biological process of "Development" was analyzed, based on the global transcriptome of the wing and pectoral region of embryos at developmental stages HH17, HH19, and HH21 (2.5 to 3.0 days of development), developed by "Embrapa Suínos e Aves" in Concórdia, SC, and obtained from the work of Contriciani *et al.* (2024). These genes were identified as being up-regulated (682) and down-regulated (498) in the transcriptome of broiler chickens compared to laying hens. The objective of this study was to identify the main regulators and molecular signaling pathways associated with the DEGs involved in the "Development" process. For this purpose, the MetaCore™ database was used to perform functional enrichment analyses and to create regulatory networks of the main genes that are up or down-regulated in broilers (TT) compared to laying hens (CC). Subsequently, sub-networks were built using a filter that selected only DEGs encoding transcription factors, receptors, and ligands to assess their interaction with transcriptional regulators in Cytoscape. Finally, a protein-protein interaction network was constructed using STRING, highlighting the proteins that are part of the TGF- β signaling pathway among the up-regulated DEGs. The main results indicated that the transcription factor KLF4 and the TGF- β signaling pathway play important roles in regulating genes associated with the accelerated growth characteristic of broiler chickens.

Keywords: KLF4; chicken embryo; development.

Title in english: Analysis of regulatory networks of differentially expressed genes in embryonic development of broiler and layer chickens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fêmeas das linhagens de corte (à esquerda) e postura (à direita).....	09
Figura 2 – Processos biológicos enriquecidos nos genes <i>up</i> e <i>down-regulated</i> , tendo como referência frangos de corte (TT).....	11
Figura 3 – Redes regulatórias do processo “Desenvolvimento”.....	13
Figura 4 – Sub-redes regulatórias do processo “Desenvolvimento” simplificadas.....	15
Figura 5 – Rede de DEGs <i>up-regulated</i> participantes da via de sinalização TGF- β	16
Figura 6 – Representação esquemática da regulação transcricional e pós-transcricional da atividade do KLF4.....	18
Figura 7 – Representação esquemática dos genes <i>up</i> e <i>down-regulated</i> identificados nas aves de corte e suas posições na via de sinalização TGF- β	19

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Linhagem de galinhas poedeiras
DEGs	<i>Differently Expressed Genes</i> , em português Genes Diferencialmente Expressos
GO	<i>Gene Ontology</i> , em português Ontologia genética
TT	Linhagem de frangos de corte

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 METODOLOGIA.....	10
2.1 Datasets utilizados neste trabalho.....	10
2.2 Análises de enriquecimento funcional e criação das redes de regulação.....	10
2.3 Análise detalhada das redes usando o Cytoscape v3.4.1.....	10
2.4 Análise das moléculas da via de sinalização TGF- β	10
3 RESULTADOS.....	11
3.1 Conjunto de dados analisados nesta pesquisa.....	11
3.2 Análise de enriquecimento funcional.....	11
3.3 Construção das redes de genes <i>up</i> e <i>down-regulated</i>	11
3.4 Simplificação das redes usando o Cytoscape.....	14
3.5 Identificação de moléculas da via de sinalização TGF- β	15
4 DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

A galinha doméstica *Gallus gallus domesticus* atualmente se destaca como a espécie mais comum na pecuária, desempenhando um papel fundamental nas sociedades humanas desde as primeiras hibridizações interespecíficas até as recentes domesticações fenotípicas para melhorar a produtividade de ovos e carne (Dudde *et al.*, 2018; Lawal *et al.*, 2020; Peters *et al.*, 2022).

Atualmente, bilhões de frangos são criados todos os anos para atender à demanda mundial de 120 milhões de toneladas de carne de frango e 1,2 trilhão de ovos todos os anos (Qanbari *et al.*, 2019). Até 2050, espera-se que a demanda por produtos pecuários dobre. Essa demanda é projetada para acompanhar o aumento da população humana à medida que ela se torna mais urbana e tem acesso a condições de vida melhores (Rashamol, 2018).

Após a domesticação, os programas atuais de melhoramento de aves têm demonstrado melhorias significativas na criação de frangos por meio de uma seleção genética direcional intensiva. Nesse processo, as características de produção dos frangos de corte e as características reprodutivas das galinhas poedeiras são otimizadas, gerando raças de frangos com características desejadas. Para alcançar esse resultado, os frangos são escolhidos sistematicamente com base em suas características particulares, realizando-se o acasalamento ao longo de várias gerações, muitas vezes em populações pequenas (Qanbari *et al.*, 2019). Como resultado, nos últimos 50 anos, houve um aumento significativo no peso corporal, no rendimento muscular e na eficiência de conversão de ração dos frangos de corte (Zuidhof, *et al.* 2014). Os frangos de corte pesam aproximadamente cinco vezes mais que as galinhas poedeiras aos 42 dias (Zhao, *et al.* 2004). Enquanto na produção de ovos, as raças comerciais de galinhas poedeiras geralmente botam cerca de 300 ovos por ano, ao passo que as fêmeas reprodutoras de frangos de corte de linhagem pura produzem em média 132,4 ovos dentro do mesmo período (Tarsani, *et al.* 2020). Como consequência, a seleção genética em frangos de corte e galinhas poedeiras têm priorizado características relacionadas ao peso corporal e à produção de ovos aprimorada, respectivamente (Qanbari *et al.*, 2019).

Figura 1 – Fêmeas das linhagens de corte (à esquerda) e postura (à direita).



Fonte: EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia-SC), 2023.

São observadas diferenças fenotípicas notáveis em peso corporal, potencial de crescimento e massa muscular entre as raças brasileiras de frangos de corte (TT) e galinhas poedeiras (CC), desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves de Concórdia, neste trabalho (Figura 1). Compreender os mecanismos moleculares subjacentes a essas variações fenotípicas em galinhas, resultantes em características distintas entre diferentes raças, pode fornecer percepções sobre o desenvolvimento de atributos variados em diferentes raças e contribuir para o aprimoramento dos programas de reprodução. Considerando essa perspectiva, analisar as diferenças no desenvolvimento se mostra um estudo essencial, já que mudanças no desenvolvimento precoce estabelecem as condições a partir das quais os fenótipos distintos emergem em aves juvenis e adultas (Clum; McClearn; Barbato, 1995).

Este projeto foi focado na análise dos DEGs *up* (de expressão aumentada) e *down-regulated* (de expressão diminuída) na linhagem de galinhas de corte (TT) em relação à de postura (CC), que pertencem ao processo biológico “Desenvolvimento”. O objetivo deste trabalho foi identificar os principais reguladores e vias de sinalização molecular associadas aos DEGs do processo “Desenvolvimento”. Para isso, utilizou-se o banco de dados GeneGo MetaCore™ para realizar o enriquecimento funcional dos genes envolvidos no processo biológico “Desenvolvimento” e a construção de redes *up* e *down-regulated*. Em seguida, utilizou-se o software Cytoscape na geração de sub-redes regulatórias para facilitar a visualização e interpretação das interações entre os genes identificados. Por fim, o STRING foi empregado para destacar a via de sinalização do TGF- β .

2 METODOLOGIA

2.1 *Datasets* utilizados neste trabalho

Os dados de RNA-seq das linhagens de frangos de corte (TT) e poederias (CC), desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves de Concórdia - SC, foram obtidos do trabalho de Contriciani *et al.* (2024). Este conjunto de dados está disponível no repositório European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/>).

2.2 Análises de enriquecimento funcional e criação das redes de regulação

A análise de enriquecimento funcional deste trabalho foi realizada utilizando o software GeneGo MetaCore™ (Clarivate Analytics) — Cortellis Solution (<https://portal.genego.com/>). Para isso, os termos GO foram corrigidos para múltiplos testes (FDR<0,05). Nestas análises, os genes considerados expressos no *dataset* foram categorizados como genes com expressão aumentada (*up-regulated*) ou diminuída (*down-regulated*), tendo como referência a linhagem de corte (TT).

O processo biológico GO “Processo de Desenvolvimento” foi escolhido, dentre os processos biológicos enriquecidos, para ser analisado em profundidade, dada a importância destes para a geração de atributos fenotípicos das aves. O processo biológico “Desenvolvimento” mostrou estar enriquecido tanto nos genes *up* quanto *down-regulated*.

Na etapa seguinte, os genes associados ao processo biológico “Desenvolvimento” foram empregados para gerar redes regulatórias pelo Metacore™.

2.3 Análise detalhada das redes usando o Cytoscape v3.4.1

As redes de regulação foram simplificadas e ilustradas usando o software Cytoscape v3.4.1, para facilitar a visualização das interações entre os DEGs e seus reguladores. Dado o grande número de genes associados ao processo biológico “Desenvolvimento”, foram construídas sub-redes empregando um filtro, no qual foram selecionados apenas os DEGs que codificam fatores de transcrição, receptores e ligantes. Em cada sub-rede foi empregado um gradiente de cor vermelho (DEGs *up-regulated*) ou azul (DEGs *down-regulated*) para indicar o nível expressão destes DEGs.

2.4 Análise das moléculas da via de sinalização TGF- β

Por fim, utilizou-se o STRING para destacar os DEGs que codificam ligantes, receptores e fatores de transcrição da rede *up-regulated* pertencentes a via de sinalização TGF- β , facilitando a visualização dessas interações. Foi utilizada uma cor vermelha para o destaque.

3 RESULTADOS

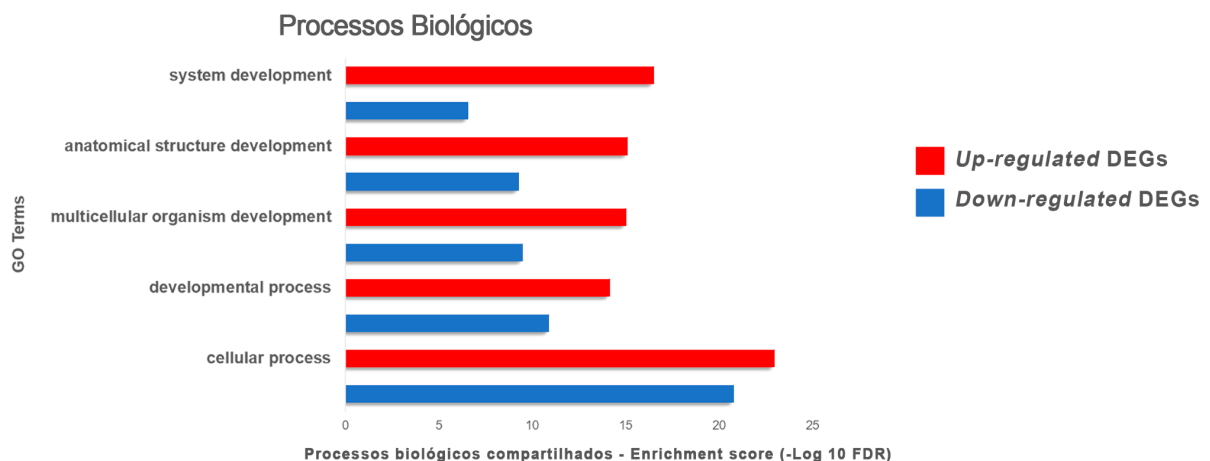
3.1 Conjunto de dados analisados nesta pesquisa

O universo de trabalho deste estudo consistiu em 2.421 genes diferencialmente expressos (DEGs) entre as linhagens TT e CC, com um nível de significância de $FDR < 0,05$. Esses DEGs foram classificados como *up-regulated* ou *down-regulated*, sendo identificados 1.199 DEGs *up-regulated* e 1.222 *down-regulated* na linhagem TT em relação a CC.

3.2 Análise de enriquecimento funcional

A partir deste conjunto de DEGs, o primeiro passo foi identificar os processos biológicos enriquecidos (termos GO) associados. A análise revelou que, como esperado, tanto os DEGs *up-regulated* quanto os *down-regulated* estão enriquecidos em processos biológicos relacionados ao desenvolvimento (Figura 2). Dentre esses processos, optamos por focar nos DEGs associados ao processo biológico “Desenvolvimento”, composto por 513 DEGs *up-regulated* e 502 *down-regulated*.

Figura 2 – Processos biológicos enriquecidos nos genes *up* e *down-regulated*, tendo como referência frangos de corte (TT).



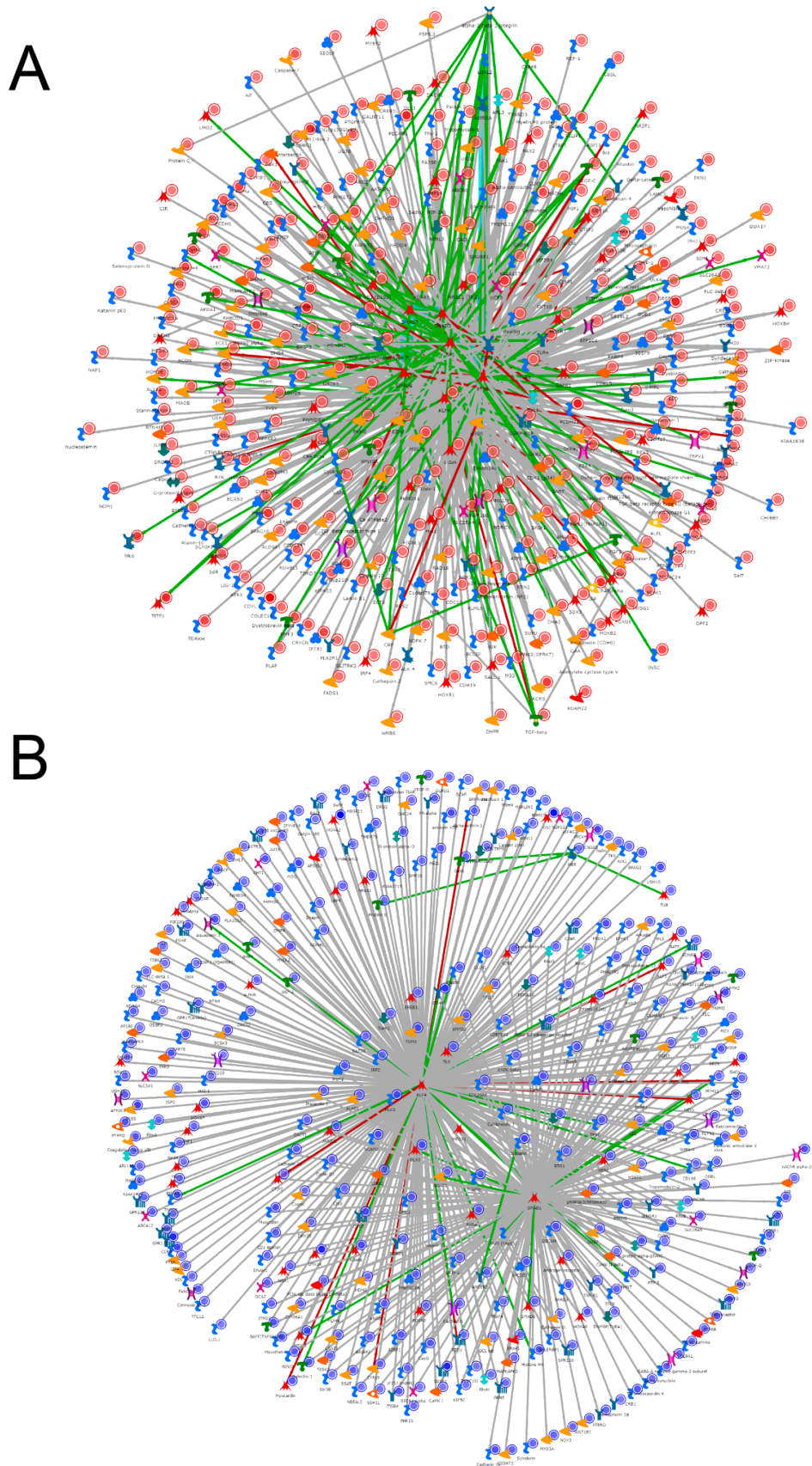
Fonte: Cedida por R. E. Contriciani, 2023.

3.3 Construção das redes de genes *up* e *down-regulated*

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) envolvidos no processo de "Desenvolvimento" foram analisados utilizando o software MetaCore™, por meio da ferramenta de identificação de reguladores dos DEGs e construção de redes regulatórias.

Ambas as redes conectaram os DEGs relacionados ao processo biológico de “Desenvolvimento”, associando-os a reguladores preditos pelo Metacore™ com base em comparações com seu banco de dados. Como resultado, foram obtidas duas redes regulatórias: uma contendo genes *up-regulated* (Figura 3A) e outra com genes *down-regulated* (Figura 3B). Nessas redes, foram identificadas 682 interações regulatórias entre os DEGs *up-regulated* e 498 entre os *down-regulated*. Entre os genes *up-regulated*, observou-se um número significativo de conexões com o gene KLF4 (log2 FC 0,47; 316 conexões). Conexões com KLF4 também foram identificadas entre os genes *down-regulated* (log2 FC 0,47; 299 conexões). Esses resultados sugerem que KLF4 desempenha um papel tanto na regulação positiva quanto negativa da expressão dos genes relacionados ao processo biológico de “Desenvolvimento”.

Figura 3 – Redes regulatórias do processo biológico “Desenvolvimento”.



Fonte: Cedida por R. E. Contriciani, 2023. A) Rede dos genes *up-regulated*. B) Rede dos genes *down-regulated*.

3.4 Simplificação das redes usando o Cytoscape

Devido à complexidade das redes dos genes *up* e *down-regulated* envolvidos no processo biológico “Desenvolvimento”, foi optado por concentrar a análise nos genes que fazem parte do toolkit genético do desenvolvimento. Este toolkit abrange genes que codificam principalmente moléculas sinalizadoras ligantes, receptores e fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento embrionário, que atuam em processos que vão desde a definição de planos corporais básicos, até a diferenciação celular para gerar células distintas como músculos e cérebro (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2014). Para realizar a análise, utilizamos o software Cytoscape v3.4.1 para simplificar ambas as grandes redes identificadas pelo MetaCore™ em seis sub-redes, categorizadas como redes de regulação de ligantes, receptores e fatores de transcrição (Figura 4).

Em todas as sub-redes geradas, o KLF4 atuou como regulador, sendo o principal regulador em redes onde a expressão está sendo aumentada, bem como quanto em redes onde a expressão está sendo reduzida.

A rede regulatória dos ligantes com expressão aumentada incluiu quatro reguladores: SMAD2, SMAD3, SP1, ETS1 e MEOX1. Os genes mais expressos foram APOA1, WNT28, BMP3, LAMC3 e CYR61, enquanto os genes TGFβ1, VEGFC, CTGF, DLL1 e NRG4 apresentaram níveis de expressão mais baixos.

Na rede regulatória de receptores com expressão aumentada, o MetaCore™ introduziu os reguladores SMAD3, SP1 e ETS1, sendo KLF4 o único regulador que é um DEG entre as aves de corte e postura. O gene NTRK apresentou o maior nível de expressão, seguido pelos genes MPL e TLR4 com expressão moderada, enquanto NPR3, TYRO3, CRCP, RYK, EPHA7, NRP2, PLA2R1, GFRA2 e TGFβR2 tiveram os menores níveis de expressão.

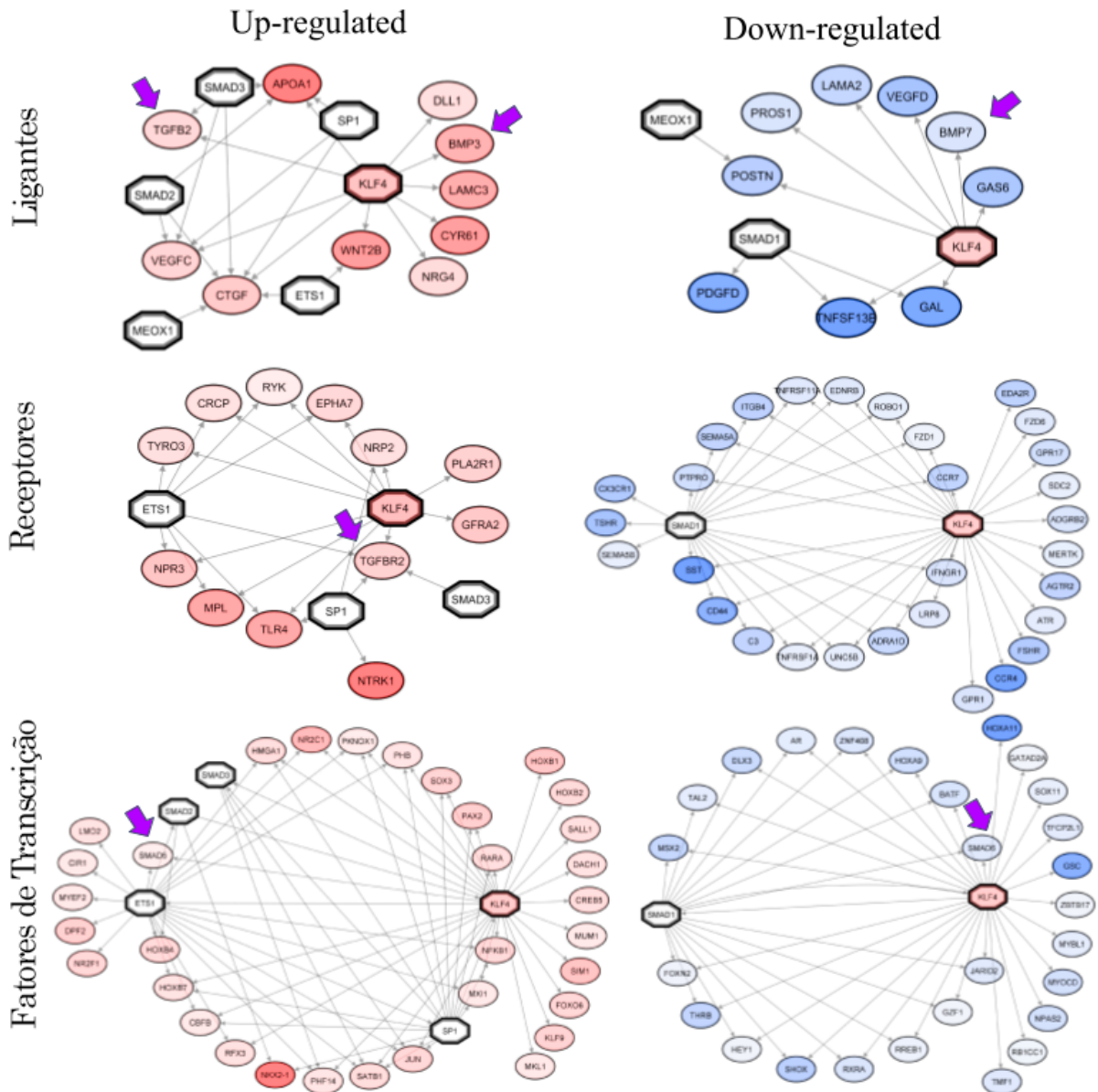
Na rede regulatória de fatores de transcrição com expressão aumentada, o MetaCore™ introduziu os reguladores SMAD2, SMAD3, SP1 e ETS1. Apenas o gene NKX2-1 apresentou alto nível de expressão, enquanto todos os outros genes, incluindo o regulador KLF4, tiveram expressão moderada ou baixa.

A rede regulatória dos ligantes com expressão reduzida mostrou que os genes TNFSF13B, GAL, PDGFD, VEGFD e GAS6 estavam mais expressos, enquanto PROS1, LAMA2 e BMP7 tiveram expressão mais baixa. Os reguladores MEOX1 e SMAD1 foram incluídos nessa rede.

Na rede regulatória de receptores com expressão reduzida, os genes SST, CD44 e CCR4 se destacaram com os níveis de expressão inferiores.

Já na rede regulatória de fatores de transcrição com expressão reduzida, os genes GSC e HOXA11 apresentaram os níveis de expressão mais reduzidos.

Figura 4 – Sub-redes regulatórias do processo biológico “Desenvolvimento”.



Fonte: Cedida por R. E. Contriciani, 2023. Octógonos representando reguladores e formas ovais representando DEGs. A intensidade das cores representa os níveis de expressão, de forma que quanto mais intensas são, maior é redução (azul) nos *down-regulated* ou o aumento (vermelho) nos *up-regulated*. Setas roxas indicam DEGs participantes da via de sinalização TGF- β .

3.5 Identificação de moléculas da via de sinalização TGF- β

Após a análise das sub-redes de DEGs *up-regulated* no Cytoscape, foi observado que elas estavam associadas a via de sinalização TGF- β . Para validar essa observação e melhorar a visualização dos dados, utilizou-se o STRING para destacar esses DEGs,

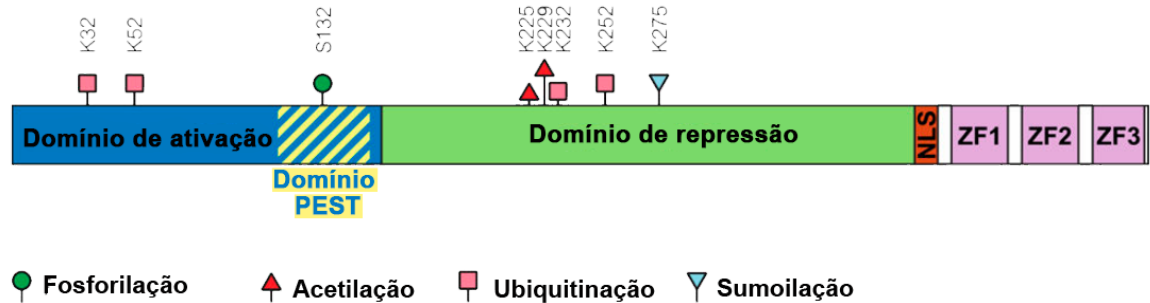
4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelam aspectos importantes do processo biológico “Desenvolvimento” nos embriões das linhagens de aves de corte e postura. A regulação positiva da expressão do KLF4 em ambas as redes, *up* e *down-regulated*, reforça sua relevância no controle do desenvolvimento embrionário. Além disso, o aumento da expressão das proteínas da via de sinalização TGF- β sugere uma participação significativa dessa via durante o processo biológico de “Desenvolvimento” dos embriões de frangos de corte.

Com base nas análises das redes regulatórias (Figura 4), os resultados indicam que o KLF4 é um regulador central dos genes diferencialmente expressos (DEGs), nos embriões de frangos de corte, que parece influenciar a proliferação celular. Por estar presente nas redes *up* e *down-regulated*, os dados sugerem que o KLF4 ativa genes como o CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo), promovendo o crescimento ao mesmo tempo que diminui a expressão de genes como o BMP7 que também promovem a proliferação celular (Holmes *et al.*, 2001; Morcillo *et al.*, 2006). Além disso, o KLF4 também regula a diferenciação celular interagindo com genes da via de sinalização TGF- β , desde seus receptores (TGF β R2), até ligantes (TGF β 2 e BMP3). Isso demonstra que a expressão gênica é regulada conforme as necessidades fisiológicas do embrião, otimizando o crescimento acelerado característico dos frangos de corte.

O KLF4 é um fator de transcrição fundamental no desenvolvimento embrionário das aves, responsável pela regulação de processos essenciais como a proliferação celular, diferenciação e manutenção da pluripotência através da regulação de vias de sinalização que alteram o crescimento e o desenvolvimento inicial (Sukparangsi *et al.*, 2022; Intarapat *et al.*, 2023). Ele pertence à família de fatores de transcrição do tipo Krüppel, caracterizada por conter um domínio de ligação ao DNA com três dedos de zinco C-terminal (Figura 6). Através desses dedos, o KLF4 se liga a sequências importantes do DNA, como o *box* GC e o *box* CACCC (Shi e Ai, 2013). Dependendo dos cofatores presentes, o KLF4 pode atuar como regulador positivo ou negativo (Gaarenstroom; Hill, 2014). Por exemplo, ligando-se diretamente ao *box* CACCC no promotor do gene da globina ele ativa este gene, o que é fundamental para a diferenciação celular e a hematopoiese (Yu *et al.*, 1991; Motamed *et al.*, 1993; Kalra; Alam; Pace, 2010). Em contraste, nos *boxes* GC, o KLF4 compete com o fator de transcrição Sp1, atuando como cofator, onde constitui a maioria da atividade de ligação ao DNA nos neurônios (Shi e Ai, 2013). Além disso, na via glicolítica, o KLF4 atua como ativador do gene PFKP (Fosfofrutoquinase Plaquetária), estimulando a produção de glicose para suportar o crescimento e a proliferação celular em células de câncer de mama, enquanto o Sp1 atua como repressor dessa atividade.

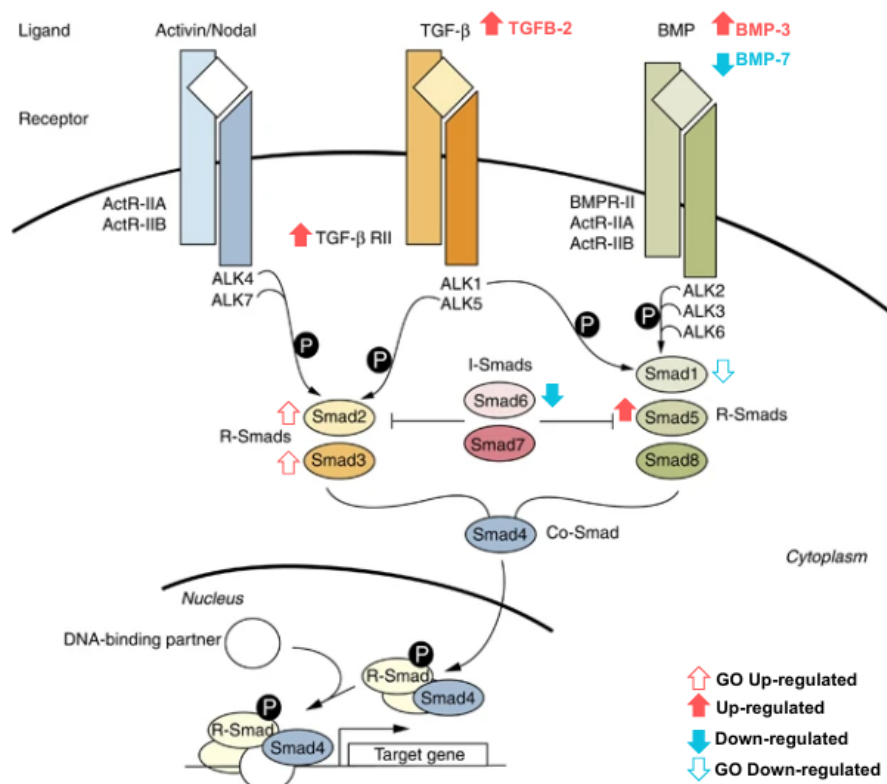
Figura 6 – Representação esquemática da regulação transcricional e pós-transcricional da atividade do KLF4.



Fonte: Alterado de Ghaleb e Young, 2017.

A ativação da via de sinalização TGF- β é evidente nas redes *up-regulated* nos embriões de corte em relação aos de postura, como demonstrados nas figuras 5 e 7. Foram observados os DEGs TGF β 2, BMP3, TGF β R2 e SMAD5, bem como adicionados pelo MetaCore™ os DEGs SMAD2 e SMAD3. Este achado é importante porque, além de sua atuação em processos de proliferação celular e diferenciação, o KLF4 também se destaca na modulação da via de sinalização TGF- β , interagindo com R-SMADs como SMAD2, SMAD3 e SMAD5, cruciais para a transdução do sinal (Kanakachari *et al.*, 2022). Ambos foram expressos nas redes *up-regulated* das aves de corte neste estudo e atuam de forma sinérgica regulando o processo de proliferação celular (Moustakas e Heldin, 2009; Massagué, 2012).

Figura 7 – Representação esquemática dos genes *up* e *down-regulated* identificados nas aves de corte e suas posições na via de sinalização TGF- β .



Fonte: Alterado de Blank e Karlsson, 2011.

Em resumo, o KLF4 e a via de sinalização TGF- β parecem desempenhar papéis importantes na regulação de genes que promovem o crescimento acelerado das aves de corte, uma vez que estão envolvidos na formação de tecidos durante o processo do desenvolvimento embrionário. Os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento de como esses fatores podem afetar o desenvolvimento, influenciando processos como a proliferação e organogênese. Esse conhecimento sobre genes que podem afetar os mecanismos moleculares subjacentes às variações fenotípicas entre as linhagens de aves pode ser aplicado na formação de novas linhagens com maior eficiência metabólica, assim como no desenvolvimento de terapias para corrigir problemas que afetem a sobrevivência e bem-estar, como a suscetibilidade das aves de corte à discondroplasia tibial.

CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho demonstrou que o fator de transcrição KLF4 e a via de sinalização TGF- β parecem atuar como reguladores importantes no desenvolvimento diferencial entre embriões de aves de corte em comparação às de postura. Esses resultados podem contribuir para entender melhor como esses fatores influenciam o processo biológico de "Desenvolvimento", oferecendo novas perspectivas para a caracterização genética e para o aprimoramento do desempenho das aves. Uma perspectiva para futuros estudos é a realização de experimentos de hibridização *in situ* em embriões de galinha, visando observar as regiões de expressão do KLF4, além da asa e da região peitoral, para validar e expandir essa discussão.

REFERÊNCIAS

ALVARES, L. E. Chicken dapper genes are versatile markers for mesodermal tissues, embryonic muscle stem cells, neural crest cells, and neurogenic placodes. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 5, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19347952/>. Acesso em: 15 mar. 2024.

American Society for Animal Science. **Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching**. 4. ed. 2020. Disponível em: https://www.asas.org/docs/default-source/default-document-library/agguide_4th.pdf?sfvrsn=56b44ed1_2. Acesso em: 15 mar. 2024.

CLUM, N. J.; MCCLEARN D. K.; BARBATO, G. F. Comparative embryonic development in chickens with different patterns of postnatal growth. **Growth Dev Aging**, v. 59, n. 3, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8675367/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CONTRICIANI, R. E. *et al.* **Phenotypic divergence between broiler and layer chicken lines is regulated at the molecular level during development**. *BMC Genomics*, v. 25, n. 168, fev. 2024. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-024-10083-x>. Acesso em: 5 mar. 2024.

DUDDE, A. *et al.* More Than Eggs - Relationship Between Productivity and Learning in Laying Hens. **Front Psychol**, v. 9, n. 2000, out. 2018. Disponível em: [doi:10.3389/fpsyg.2018.02000](https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02000). Acesso em: 17 mar. 2024.

GAARENSTROOM, T; HILL, C. S. TGF- β signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.32, fev. 2014. Disponível em: [doi:10.1016/j.semcdb.2014.01.009](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.009). Acesso em: 07 ago. 2024.

HASHIMSHONY T.; YANAI I. Revealing developmental networks by comparative transcriptomics. **Transcription**, v. 1, n. 3, nov. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21326891/>. Acesso em: 22 mar. 2024.

HOLMES, A. *et al.* CTGF and SMADs, Maintenance of Scleroderma Phenotype Is Independent of SMAD Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, abril 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11152469/>. Acesso em: 07 set. 2024.

INTARAPAT, S., *et al.* A Bird's-Eye View of Endangered Species Conservation: Avian Genomics and Stem Cell Approaches for Green Peafowl (*Pavo muticus*). **Genes**, v. 14, n. 2040. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes14112040>. Acesso em: 18 set. 2024.

KALRA, I. S.; ALAM, M.; PACE, B. S. Transcriptional Regulation of γ -Globin Gene Expression by KLF4. **Blood Journal**, v. 116, n. 21, nov. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.V116.21.645.645>. Acesso em: 25 set. 2024.

KANAKACHARI, M., *et al.* Embryonic transcriptome unravels mechanisms and pathways underlying embryonic development with respect to muscle growth, egg production, and plumage formation in native and broiler chickens. **Frontiers in Genetics**, 14 out. 2022. Disponível em: [doi:10.3389/fgene.2022.990849](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.990849). Acesso em: 25 set. 2024.

LAWAL, R. A. *et al.* The wild species genome ancestry of domestic chickens. **BMC Biology**, v. 18, n. 13, fev. 2020. Disponível em:

<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-020-0738-1>. Acesso em: 14 mar. 2024.

MASSAGUÉ, J. TGF β signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, 20 set. 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3434>. Acesso em: 15 set. 2024.

MORCILLO, J., *et al.* Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. **Development**, v. 133, n. 16, 14 jun. 2006. Disponível em: [doi:10.1242/dev.02493](https://doi.org/10.1242/dev.02493). Acesso em: 20 set. 2024.

MOTAMED, K., *et al.* CACC box and enhancer response of the human embryonic Eglobin promoter. **Gene**, v. 123, 1993. Disponível em: DOI: 10.1016/0378-1119(93)90129-q. Acesso em: 22 set. 2024.

MOUSTAKA, A.; HELDIN, C. H. The regulation of TGF β signal transduction. **The Company of Biologists**, n. 22, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.030338>. Acesso em: 20 set. 2024.

PETERS, J. *et al.* The biocultural origins and dispersal of domestic chickens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 119, n. 24, mar. 2022. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2121978119>. Acesso em: 14 mar. 2024.

RASHAMOL, V.P.; SEJIAN, V. Climate resilient livestock production: way forward. **Dairy Vet Sci J**, v. 5, n. 5, abril 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/328264658_Climate_Resilient_Livestock_Production_Way_Forward. Acesso em: 16 mar. 2024.

QANBARI, S. *et al.* Genetics of adaptation in modern chicken. **PLoS Genet**, v. 15, n. 4, abril 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6508745/>. Acesso em: 18 mar. 2024.

SHI, Y e AI, W. Function of KLF4 in Stem Cell Biology. **Pluripotent Stem Cells**, 28 ago. 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/45140>. Acesso em: 24 set. 2024.

TARSANI, E. *et al.* Deciphering the mode of action and position of genetic variants impacting on egg number in broiler breeders. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, jul. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32709222/>. Acesso em: 19 mar. 2024.

YU, Z. Y. *et al.* The CACC Box Upstream of Human Embryonic Globin Gene Binds Spl and 1s.aFunctional Promoter Elementin Vitro and in Vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 14, 24 set. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2026603/>. Acesso em: 20 set. 2024.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 5ed. São Paulo: Editora Artmed, 2014.

ZHAO, R., *et al.* Effect of genotype-nutrition interaction on growth and somatotropic gene expression in the chicken. **Gen Comp Endocrinol**, v. 136, n. 1, mar. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14980790/>. Acesso em: 17 mar 2024.

ZUIDHOF, M. J. *et al.* Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. **Poult Sci**, v. 93, n. 12, set. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25260522/>. Acesso em: 17 mar, 2024