



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIANA APARECIDA DROVAL

**CARNE PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGOS.
MUTAÇÕES NO GENE RECEPTOR DA RIANODINA TIPO 3
E ALTERAÇÕES NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS**

Londrina
2004

ADRIANA APARECIDA DROVAL

**CARNE PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGOS.
MUTAÇÕES NO GENE RECEPTOR DA RIANODINA TIPO 3
E ALTERAÇÕES NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina como cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador Prof. Dr. Massami Shimokomaki

Londrina
2004

ADRIANA APARECIDA DROVAL

**CARNE PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGOS. MUTAÇÕES
NO GENE RECEPTOR DA RIANODINA TIPO 3 E ALTERAÇÕES NO
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Massami Shimokomaki

Prof. Dr. João Waine Pinheiro

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Londrina, 19 de abril de 2004.

Dedicatória

Aos meus pais, Vitor (“in memorium”) e Iria por acreditarem e serem responsáveis pela minha trajetória na busca por esta vitória.

Ao meu irmão Marcelo pelo incentivo, companheirismo e dedicação sempre prestada.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelo Dom da vida e coragem de sempre seguir em frente.

Á minha família, pela compreensão de que cada ausência minha, hoje se concretiza em belos frutos.

Ao meu orientador Dr. Massami Shimokomaki, com muito carinho pela dedicação, apoio e incentivo na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Nepomuceno, pelas orientações, colaboração e inestimável amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e auxílio financeiro deste trabalho.

Á Silvana Regina Rocknbach Marin e ao Dr. Eliseu Binneck pelas sugestões e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

A todos os meus amigos e principalmente a Cristiane Canan pelos momentos inesquecíveis: da alegria ao desespero; do carinho às rugas; do companheirismo às divergências; da luta á vitória; o meu muito obrigada.

Aos meus colegas Jorge Antônio Ferreira Lara e Sandra Helena Oda pela ajuda e colaboração prestada, e principalmente pelas amostras cedidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Embrapa-Soja e aos amigos do Laboratório de Biotecnologia (Renata Stolf, Renata Fuganti, Noéle, César, Rodrigo, Magda, Águida, Fernanda, Sandra, Juliana, Lizandra, Solange e Vera), pelos momentos alegres, de companheirismo e amizade. Valeram todas as risadas!

As minhas amigas eternas, Lidiane e Sascha por acreditarem no meu potencial, pelo incentivo e por toda a ajuda prestada. Muito Obrigada!

Ao Professor Makoto Matsushita e ao aluno de mestrado, Marcos Roberto Ruiz da Universidade Estadual de Maringá pelo auxílio e contribuições nas análises cromatográficas.

A Embrapa Soja, por me fornecer toda a infra-estrutura para o desenvolvimento deste trabalho, e por permitir que eu faça parte de sua grande família.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos e a Universidade Estadual de Londrina, pela acolhida e oportunidade de crescimento proporcionado.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

DROVAL, Adriana A. **Carne PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos. Mutações no gene receptor da rianodina tipo 3 e alterações no perfil de ácidos graxos.** 2004. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar as possíveis mutações no gene receptor de rianodina tipo 3 e ao mesmo tempo avaliar as mudanças no perfil de ácidos graxos em linhagens de frangos de cortes (*Gallus domesticus*) que apresentaram características de carne PSE. Para o primeiro estudo, foram utilizados amostras de DNA extraídas de frangos da população referência para mapeamento de QTL abatidos com 41 a 45 dias de idade em abatedouro experimental na Embrapa Suínos e Aves de Concórdia/SC, e é uma continuação de experimentos realizados anteriormente. As aves utilizadas foram provenientes do cruzamento entre duas linhagens de genótipos diferentes: uma linhagem de frangos de corte que possui alta taxa de crescimento com outra de postura que apresenta baixa taxa de crescimento desenvolvido pela Embrapa Suínos e Aves. A população de frangos obtida do cruzamento (F3) foi dividida em dois grupos: controle, aquele em que as aves permaneceram sem estresse térmico e estressado em que os animais foram submetidos ao estresse físico. No segundo experimento, as amostras foram colhidas em uma linha comercial. Nos dois casos, as amostras foram classificadas como carnes PSE ou controle obedecendo aos parâmetros determinados anteriormente (Carnes PSE: pH < 5,8 e L* > 53,0 e Controle pH > 5,8 e 44,0 ≤ L* ≤ 53,0). Foram avaliados 3 fragmentos pertencentes a 2 domínios (*pfam* 1365.8) da RYR3 de 134bp, 129bp e 384bp, e infelizmente esse último não foi amplificado pela técnica de PCR. Foram observadas mutações nos 2 fragmentos restantes, mas os polimorfismos encontrados não puderam ser associados ao fenômeno PSE em aves porque não foram transcritos em aminoácidos diferentes na sua seqüência em relação ao controle. Na determinação do perfil de ácidos graxos não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras de carne de frango normal e PSE embora houvesse um teor ligeiramente mais acentuado de ácidos graxos poliinsaturados nas amostras PSE (PSE: 26,36 % ± 5,04; Controle: 25,62 % ± 1,60), com destaque para o ácido araquidônico (PSE: 2,11 % ± 0,87 Controle: 1,69 % ± 0,20). Essa elevação quantitativa pode estar associada ao fenômeno PSE, devido ao aumento da atividade da fosfolipase A₂ que pode levar a liberação deste ácido e interferir na qualidade final da carne.

Palavras-chave: Filés de frango. Estresse térmico. Ácido araquidônico.

DROVAL, Adriana A. **Chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) Meat. Ryanodine Receptor Type 3 Gene Mutation and Changes in Fatty Acids Profile.** 2004. 119f. Dissertation (Master of Science in Food Science) - Londrina State University- Londrina.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate possible mutations of chicken (*Gallus domesticus*) Ryanodine type 3 gene receptor (*ryr3*) and on the same time to analyze changes on fatty acids in chicken meat both with PSE meat characteristics. In the first experiment, DNA samples extracted from birds of reference population for QTL mapping of 41 to 45 of age at EMBRAPA – Concordia, SC. Also it is a sequence of this research group previous study on search for *ryr3* mutation in stressed chicken, which led eventually to PSE meat. Samples analyzed were originated from crossing two birds' genotype lineages being one group having a high index of growth and the other with high laying eggs characteristics both developed by Embrapa, SC. The obtained chicken population (F3) was divided into two groups: Control group and Thermal stressed group. In the second experiment samples were collected from commercial slaughterhouse plant. In both cases, meat samples were classified as PSE and control based on the previous implemented parameters ie. PSE meat with $\text{pH} < 5.8$ and $L^* > 53.0$ and Control meat with $\text{pH} > 5.8$ and color of $44.0 \leq L^* \leq 53.0$. Three fragments from 2 domains (pfam 1365.8) of RyR3 of 134bp, 129bp and 384 bp were studied and unfortunately the latter was not PCR amplified. Mutations were detected in the remained two fragments but the found polymorphisms were not associated with PSE meat because the transcribed aminoacids sequence was not different from the control group. Finally, on the fatty acids (FA) profile determination, it was not detected significantly different ($p \leq 0,05$) values although a higher amount of polyunsaturated fatty acids was observed in PSE meat (PSE: $26.36 \% \pm 5.04$; control: $25.62 \% \pm 1.60$) with emphasis on arachidonic acid fraction (PSE: $2.11 \% \pm 0.87$ Control: $1.69 \% \pm 0.20$). This relative high amount of this FA is probably the reflex of higher activity of phospholipase A_2 liberating this FA and being this enzymatic event a possible triggering factor for the PSE symptoms development.

Key words: Broiler breast fillet. Thermal stress. Arachidonic acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 mRNA da RyR1 e RyR3 nos tecidos de frango.....	29
FIGURA 2 Análise de <i>Western-blot</i> das proteínas.....	29
FIGURA 3 Domínios Conservados do gene receptor de RyR3 em <i>G. gallus</i>	35
FIGURA 4 Diagrama esquemático dos fragmentos estudados do gene RyR3	36
FIGURA 5 Esquema de construção gênica do plasmídeo pGEM-T Easy Vector.....	40
FIGURA 6 Mecanismo de excitação-contração muscular do músculo esquelético de aves	55
FIGURA 7 Mecanismo de excitação-contração muscular do músculo esquelético de mamíferos	55
FIGURA 8 Produtos de PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% do hipotético <i>exon 2</i>	58
FIGURA 9 Produtos de PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% do hipotético <i>exon 4</i>	58
FIGURA 10 Seqüências de DNA das regiões exônicas estudadas do gene <i>ryr3</i> de frango comparadas com a seqüência disponível no GenBank	60
FIGURA 11 Seqüências de DNA das regiões exônicas estudadas do gene <i>ryr3</i> de frango comparadas com a seqüência disponível no GenBank	63
FIGURA 12 Correlação entre os valores de pH _{24h} e de L* _{24h} das amostras de carne de frangos normais e PSE.....	68
FIGURA 13 Perfil de ácidos graxos das amostras de carne de frango.....	70
FIGURA 14 Teor de ácido araquidônico (C _{20:4n6} – AA) nas amostras de carne normal (Padrão) e PSE (Estressado).....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 <i>Primers</i> selecionados para <i>exons</i> hipotéticos que compreendem os domínios 1 e 2 em RyR3 em frangos	36
TABELA 2 Concentrações e volumes dos reagentes empregados na PCR	37
TABELA 3 Classificação das amostras de carne de frango Normais e PSE	53
TABELA 4 Resumo dos resultados para o hipotético <i>exon 2</i>	61
TABELA 5 Tradução em aminoácidos – <i>Blastx</i> para o hipotético <i>exon 2</i> das amostras que apresentaram alteração na seqüência de nucleotídeos	62
TABELA 6 Resumo dos resultados para o hipotético <i>exon 4</i>	64
TABELA 7 Tradução em aminoácidos – <i>Blastx</i> para o hipotético <i>exon 4</i> das amostras que apresentaram alteração na seqüência de nucleotídeos	64
TABELA 8 Valores de L* e pH (24 horas) nas amostras de carne de frango normal e PSE	67
TABELA 9 Composição de ácidos graxos das amostras de peito de frango com características normais e PSE (%)	69
TABELA 10 Resumo do perfil de ácidos graxos das amostras de carne de frango com características normais e PSE	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
CG	Meio de cultura <i>Circle Grow</i>
CRA	Capacidade de retenção de água
cDNA	DNA complementar
DHPR	Receptores de Dihidropiridina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DFD	Escura, Firme e Seca
EDTA	Ácido etileno diamono tetracético
Gene <i>HAL</i>	Gene halotano
Gene <i>RN</i>	Gene rendimento napole
HM	Hipertermia Maligna
IPTG	Isopropil- β -thiogalactopyranoside
IP ₃	3 – Inositol fosfato
IP ₃ R	Receptores de Inositol fosfato
KOAc	Acetato de Potássio
L*	Luminosidade do sistema de cor CIELAB
LB	<i>Lennox L Broth Base</i> (Meio de cultura)
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center of Biological Information</i>
PLA ₂	Enzima Fosfolipase A ₂
PSE	Pálida, macia e Exsudativa
PSS	Síndrome do Estresse Suíno
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RFLP	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotação por minuto
RYR	Receptores de rianodina
RYR1	Proteína rianodina 1
RYR2	Proteína rianodina 2

RYR3	Proteína rianodina 3
SNP	Polimorfismo de um nucleotídeo (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
TBE	Tampão – Tris, Ácido Bórico e EDTA
UV	Ultra-violeta
X-GAL	5-bromo-e-cloro-3-indolyl- β -D-galactose
Ω	Omega
V	Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE	18
3.2 CARNE PSE	20
3.3 DESENVOLVIMENTO DE CARNE PSE EM AVES	23
3.3.1 Parâmetros de Classificação para a Carne PSE em Aves.....	26
3.4 RIANODINA.....	26
3.5 A GENÉTICA E A INDÚSTRIA AVÍCOLA	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 ETAPA 1.....	32
4.1.1 Matéria-prima	32
4.1.2 Extração do DNA	33
4.1.3 Seleção das regiões gênicas para estudo e desenho dos <i>Primers</i>	34
4.1.4 Amplificação	36
4.1.5 Separação dos Produtos de PCR.....	37
4.1.6 Separação e Purificação das Bandas.....	37
4.1.7 Clonagem.....	38
4.1.7.1 Reação de Ligação.....	39
4.1.7.2 Eletroporação e plaqueamento de células competentes.....	40
4.1.8 Extração do DNA plasmidial.....	41
4.1.8.1 Digestão	42
4.1.8.2 Eletroforese.....	43
4.1.9 Seqüenciamento.....	43
4.1.9.1 Seqüenciamento por ciclagem térmica.....	43

4.1.9.2 Precipitação alcoólica do DNA	44
4.1.9.3 Separação dos fragmentos amplificados	44
4.1.10 Análise dos Resultados	45
4.2 ETAPA 2.....	48
4.2.1 Matéria-prima	48
4.2.2 Caracterização da Carne PSE	48
4.2.3 Determinação do perfil de Ácidos Graxos	49
4.2.3.1 Extração dos lipídios	49
4.2.3.2 Hidrólise e transesterificação dos triacilgliceróis.....	50
4.2.3.3 Cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos	50
4.2.4 Análise Estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 ETAPA 1.....	52
5.1.1 Extração do DNA	52
5.1.2 Gene candidato estudado.....	54
5.1.3 Seleção das regiões gênicas para estudo e desenho dos <i>Primers</i>	57
5.1.4 Análise do Seqüenciamento e da estrutura primária dos fragmentos estudados no gene <i>ryr3</i>	59
5.2.1 Caracterização da carne PSE.....	67
5.2 ETAPA 2.....	67
5.2.2 Determinação do perfil de ácidos graxos	68
6 CONCLUSÕES.....	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS.....	79
ANEXO A.....	80
ANEXO B	86
ANEXO C	118

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor, e em 2003 foi considerado o maior exportador mundial de carne de frango, exportando próximos a US\$ 2 bilhões, correspondendo à aproximadamente 23% da produção (ABEF, 2004). A ampliação de mercados internacionais se deve à qualidade do frango produzido no país, aos preços competitivos praticados pelos produtores e aos recentes problemas com dioxina e a vaca louca (BSE) (NAKAMAE e PARAGUAÇU, 2002; UBA, 2004). No ano de 2000 o frango brasileiro chegou a 46 países, e atualmente é distribuído para mais de 120 nações (ABEF, 2003). O consumo *per capita* de carne de frango em 2002 girou em torno de 33,8 Kg/habitante/ano, 3% a mais que os 29,9 Kg no ano de 2000 (NAKAMAE e PARAGUAÇU, 2002; ABEF, 2003). A avicultura é hoje uma das grandes responsáveis pelo aumento do consumo de proteínas pela população brasileira. No período de 1990 a 2000, a produção nacional de carne de frango cresceu 150%, enquanto a da carne suína 80% e finalmente da carne bovina cresceu apenas 60% (CARVALHO, 2002).

A carne PSE do inglês *Pale, Soft, Exudative*, é definida como uma carne pálida, flácida e exudativa, respectivamente, causada por um rápido e profundo decréscimo *post-mortem* do pH, enquanto a temperatura do músculo está elevada causando uma desnaturação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (PRICE e SCHWEIGERT, 1994). O fenômeno PSE tem sido estudado há mais de trinta anos em suínos (MITCHELL e HEFFRON, 1982, LOUIS et al., 1993), e ultimamente vem sendo observado em aves de corte (BARBUT, 1997; 1997a; OLIVO et al. 2001). A incidência de PSE na indústria avícola brasileira apresenta um percentual de 15 a 20%, dependendo das condições de manejo pré-abate (SOARES et al., 2003).

As aves susceptíveis ao estresse desenvolvem carne PSE principalmente nos músculos do peito (OLIVO et al., 1998). A correta manipulação das aves nas horas que precedem o abate são indispensáveis para a obtenção de produtos com qualidade (LARA et al., 2002). O calor é considerado um importante fator de estresse para os frangos de corte com conseqüente aumento na incidência de PSE (GUARNIERI et al., 2002).

As propriedades funcionais da carne intimamente afetadas pelo fenômeno PSE representam um sério problema para a indústria devido a sua baixa capacidade de retenção de água com perda excessiva do exsudado, uma textura caracterizada por uma extrema flacidez, ausência de cor (SOLOMON et al., 1998), baixo rendimento e inaceitável apreciação pelo consumidor (LEDUR et al., 2002).

O PSE foi descrito em suínos como resultado de uma mutação genética na proteína receptora de rianodina (RYR) codificada pelo gene halotano (FUJII et al., 1991) e com a atividade da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que é considerada como indutora dos processos bioquímicos, a qual pode ser ativada pelo Ca⁺² e então hidrolisar os fosfolipídios da membrana, resultando na formação de ácidos graxos insaturados de cadeia longa e metabólitos que conduzem as características do PSE (CHEAH et al., 1986). Ledur et al. (2002) investigaram os genes receptores de rianodina 1 (*ryr1*) e rianodina 3 (*ryr3*) em aves de corte. Esses genes estão expressos nas células musculares e estão intimamente relacionados com o mecanismo de regulação da concentração do cálcio mioplasmático no músculo.

O presente trabalho foi dividido em dois estudos. O primeiro estudo teve por objetivo determinar a seqüência do DNA genômico no gene que codifica as proteínas receptoras de rianodina em genótipos de frangos de cortes (*Gallus domesticus*) que apresentam o desenvolvimento característico de carne PSE. O segundo estudo foi realizado com o objetivo de comparar o perfil de ácidos graxos presente em carnes de frangos comerciais PSE e não PSE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar variações moleculares no gene receptor de rianodina e variações bioquímicas em genótipos de frangos de cortes (*Gallus domesticus*) que apresentam características do desenvolvimento de carne PSE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Sequenciar regiões codificadoras dos genes que codificam para as proteínas receptoras de rianodina RYR3 em genótipos de frangos de cortes que apresentam o desenvolvimento de carne PSE, visando:

- Correlacionar possíveis variações das regiões genômicas estudadas com o desenvolvimento (ou não) de carne PSE.

- Verificar possíveis mutações em fragmentos (*exons* hipotéticos) representando domínios específicos do gene receptor da rianodina tipo 3 (*ryr3*) em *Gallus gallus*.

b) Avaliar o perfil dos ácidos graxos em carne de frango comercial e frango PSE, visando:

- Identificar, quantificar e comparar o perfil de ácidos graxos presentes em frangos de corte normais e PSE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE

Os fatores que influem na maior parte das características de qualidade são semelhantes, independentemente da espécie que deu origem à carne (suíno, bovino, ave, ovelha, etc). A qualidade final da carne fresca depende das principais modificações metabólicas que acontece no músculo no momento imediato ao sacrifício e nas conseqüentes reações físicas e químicas. A fisiologia do animal e as manipulações a que se submetem as carnes depois do sacrifício influenciam nas reações metabólicas que ocorrem antes, durante e depois do *rigor mortis* (PRICE e SCHWEIGERT, 1994; BERAQUET, 1999; GUARNIERI et al., 2002).

O termo qualidade engloba uma série de propriedades responsáveis por transformar a carne em um produto comestível de aspecto atrativo, apetitoso, nutritivo e agradável ao paladar. A qualidade ideal da carne deve estar relacionada com a capacidade de reter um elevado valor nutritivo quando a mesma é submetida ao processamento mantendo as suas propriedades funcionais que influenciam na fabricação dos produtos. Dentre estas propriedades funcionais estão a capacidade de retenção de água (CRA), formação de emulsão, melhoramento na viscosidade, produção de géis e espuma, estabilizante, ligante, contribuição do aroma, textura e rugosidade do produto cozido (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

A velocidade da glicólise *post-mortem* pode ser afetada por numerosos fatores intrínsecos e extrínsecos. Os principais fatores intrínsecos são a espécie, o genótipo, a idade, o tipo de músculo e a localização do mesmo. E entre os fatores extrínsecos estão a exposição do animal ao estresse sob temperaturas elevadas antes e durante a glicólise interferindo nas

propriedades funcionais da carne, diminuindo a sua qualidade (VARNAM e SUTHERLAND, 1998).

A CRA pode ser medida pela perda de peso durante o cozimento. Podendo ser definida como a capacidade da carne em reter sua própria água durante a aplicação de forças externas, tais como cortes, aquecimento, trituração e prensagem (PARDI et al., 1995). As condições da criação dos animais, como a temperatura, estresse calórico e densidade podem afetar essa característica (LARA et al, 2002; OLIVO et al., 2001).

A cor da musculatura varia com a espécie e a sua intensidade aumenta com a idade. A diferença de cor se deve em grande parte pelo teor de mioglobina no músculo e sua concentração, tipo e natureza química do pigmento. A cor específica da carne fresca depende em grande parte da proporção relativa e da distribuição das três formas da mioglobina: mioglobina reduzida de cor púrpura, oximioglobina vermelho e metamioglobina marrom (PRICE e SCHWEIGERT, 1994; PARDI et al., 1995). A mioglobina contribui com um percentual de 80 a 90% do pigmento total (PARDI et al., 1995).

A carne de bovino de cor escura (DFD – *Dark, Firm e Dry*) e de suíno de cor pálida (PSE), constituem dois exemplos de variações extremas de cor causadas ou relacionadas com reações estruturais. A carne de bovino DFD possui um pH elevado, muito superior ao ponto isoelétrico da actomiosina, fazendo com que as proteínas retenham mais água e, a carne de suíno PSE possui um pH baixo e uma baixa capacidade de retenção de água (PRICE e SCHWEIGERT, 1994). As propriedades funcionais como a cor e a textura, também estão relacionadas com a qualidade da carne (LEDUR et al., 2002).

3.2 CARNE PSE

A musculatura PSE (pálida, flácida e exudativa) é causada por um rápido decréscimo do pH *post-mortem*, enquanto a temperatura do músculo está elevada, acima de 35°C. Estas reações produzem uma desnaturação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares e uma perda muito acentuada da capacidade das proteínas de ligar a água. Este fenômeno em suínos pode aparecer aproximadamente nos trinta e nove minutos *post-mortem*. Quando o pH desce até aproximadamente 5,4 alcançando-se o ponto isolétrico da miosina, determinando a retração das fibrilas e a carne apresenta uma estrutura mais aberta, favorável à penetração de sais (PRICE.e SCHWEIGERT, 1994). O processo de conversão do músculo em carne é complexo e envolve uma série de alterações no metabolismo celular bem como na estrutura protéica, que se caracterizam pelo esgotamento das reservas de ATP, diminuição do pH ou acidificação, queda da temperatura da musculatura, aumento da concentração de íon de cálcio no citosol, *rigor mortis*, entre outros (LAWRIE, 1998).

Certas raças de suínos especialmente Landrace, Hampshire e Piétrain estão pré-dispostas a produção de PSE. O metabolismo *post mortem* que resulta na hidrólise do glicogênio muscular é o fator determinante da variação dos atributos de qualidade encontrada na carne suína fresca e está diretamente relacionado a dois genes: a) gene halotano, que está associado a velocidade da glicólise *post-mortem* e à sensibilidade ao anestésico halotano (Gene *Hal*) e, b) gene “*Rendement Napole*” (RN), que está associado a intensidade com que ocorre o desdobramento do glicogênio muscular, ambos afetam drasticamente a cinética do abaixamento do pH muscular (VARNAM e SUTHERLAND, 1998; RÜBENSAM, 2000). O pH exerce influência, direta ou indireta sobre as diversas características de qualidade da carne, como a cor, capacidade de retenção de água, maciez, suculência e sabor (RÜBENSAM,

2000). A sensibilidade ao anestésico halotano pode ser usado como um marcador do desenvolvimento potencial da condição PSE (WHEELER et al., 1999). O teste do halotano se baseia no tempo adquirido pelo animal para recuperar-se após ter sido anestesiado com halotano. Aqueles suínos que se recuperam rapidamente não são sensíveis ao estresse e ao contrário, os sensíveis, metabolizam o halotano mais lentamente e, portanto necessitam mais tempo para recuperar-se (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

Estudos subsequentes relatam que o gene envolvido na resposta ao estresse denominado *HAL* está localizado no cromossomo 6, responsável pela codificação de proteínas nas membranas do músculo que controlam o vazamento dos íons de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (MICKELSON e LOUIS, 1996). Estes receptores de cálcio são conhecidos como receptores de rianodina e recebem esta denominação por ser a rianodina um alcalóide derivado de uma planta com a propriedade de se ligar somente aos canais de cálcio que permanecem abertos, deixando estes íons livres no citosol do retículo sarcoplasmático (LAWRIE, 1998). O excesso de cálcio vazado no interior das fibras pode ser até 5 vezes mais concentrado no retículo sarcoplasmático do PSE em relação ao do normal e vai provocar a rápida contratura muscular. Em consequência ocorre a aceleração do metabolismo anaeróbio, a glicólise e a consequente formação de acidose em temperatura corporal elevada, provocando a desnaturação das proteínas miofibrilares. A consequência em alguns casos é a morte súbita dos animais que em suínos, pode ser de 4 a 6 minutos após o surgimento dos sintomas (MICKELSON e LOUIS, 1996). Essa condição em suínos é conhecida como Síndrome do Estresse Suíno, da língua inglesa *Porcine Stress Syndrome* ou PSS com a subsequente formação de PSE. Identificada como uma mutação genética denominada polimorfismo de um nucleotídeo (SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*) (FUJII et al., 1991; BEUZEN et al., 2000). O fenômeno é possível de acontecer em humanos, aqueles que são sensíveis a anestésicos, provocando contratura muscular, ou seja, desordens na musculatura esquelética, e

a possibilidade de uma elevação fatal de temperatura corporal, conhecido como Hipertermia Malignante. A estatística americana revela que, em pacientes anestesiados, essa síndrome ocorre um caso em cada 15.000 crianças e um caso entre 50.000 adultos (McLENNAN e PHILLIPS, 1992; MICKELSON e LOUIS, 1996; OLIVO et al., 1998).

O melhor método para prevenir o estado PSE em suínos é a seleção genética de raças de animais resistentes ao estresse (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

Investigações sobre a ocorrência de carne suína PSE, apontam a genética como fator relevante. Embora tenha havido uma redução da influência do componente genético, através da utilização de reprodutores livres do gene halotano, a incidência de carne PSE continua elevada. Fatores ligados ao manejo pré-abate, principalmente durante o transporte dos animais ao matadouro e durante o período de descanso que antecede ao abate estão associados à incidência de carne PSE (RÜBENSAM, 2000). Dentre estes fatores podemos citar: perturbações emocionais, temperaturas extremas ou flutuantes, som, umidade, pressão atmosférica, nutrição imprópria, estímulos elétricos, brigas, medo, luz, fadiga, fome, anoxia, ambientes estranhos e outros como por exemplo o grande intervalo entre o atordoamento e a sangria (PARDI et al., 1995). Se a ocorrência de carne PSE se deve à genética (fatores intrínsecos) ou aos fatores ambientais (extrínsecos), o estresse pré-abate é provavelmente o principal fator de esgotamento das reservas de glicogênio muscular (RÜBENSAM, 2000).

3.3 DESENVOLVIMENTO DE CARNE PSE EM AVES

O processo de *rigor mortis* na carne de aves é relativamente rápido. Os músculos do peito de frangos processados comercialmente, por exemplo, podem entrar em

rigor uma hora após o abate, podendo ocorrer variações em um mesmo lote. Sabe-se que a velocidade da glicólise pode variar e pode produzir tanto condições PSE como DFD (VARNAM e SUTHERLAND, 1998).

Acredita-se que a intensa atividade na seleção das linhagens, pela necessidade econômica de abater aves em menor tempo de vida, com rápido ganho de peso, possa ter resultado em comportamentos fisiológicos anormais (OLIVO et al., 1998).

A condição PSE em aves é mais observada nos músculos peitorais, pois estes demoram mais tempo para sofrerem o processo de resfriamento, especialmente frangos e patos de alto peso (OLIVO et al., 1998). A cor pálida e a menor capacidade de retenção de água da carne do peito estão correlacionadas a um pH final menor. Geralmente, a carne do peito de frangos de corte apresenta um pH final variando de 5,7 a 5,96 em carne normal (OLIVO et al., 1998; OLIVO, 1999). Problemas de textura decorrem geralmente por alterações na estrutura miofibrilar, determinada pelo aparecimento rápido do *rigor mortis* em função do estresse pré-abate. A maciez está associada à capacidade de retenção de água apresentada pelo músculo. Alguns defeitos de cor e textura observados podem ser devido à alimentação, manejo ou estresse das aves antes do abate (SOARES et al., 2002).

Geneticamente existe uma susceptibilidade ao fenômeno PSE em certas espécies de patos e frangos, porém não existem informações suficientes para chegar a decifrar a causa genética desta condição. Uma das explicações da causa deste fenômeno em aves pode ser em alguns casos verificado pela incapacidade da regulação dos fluxos dos íons de cálcio nos diferentes compartimentos da célula muscular. O cálcio é um fator regulador chave da contração e relaxamento muscular e o não balanceamento desses fluxos podem alterar drasticamente a energia metabólica e a atividade muscular (ROCHA, 2000).

O meio ambiente, a estação do ano e o estresse das aves antes do sacrifício podem influenciar na incidência de carne PSE. A aspersão de água e a ventilação aos frangos

no período que antecede o abate inibem significativamente a ocorrência de PSE. O banho/ventilação na recepção tem a capacidade de restaurar a injúria física causada pelo transporte mantendo a qualidade das carnes de aves (GUARNIERI et al., 2002).

O estresse pelo calor pode promover nas aves mudanças nos parâmetros glicolíticos levando ao desenvolvimento de carne PSE. Olivo et al. (2001) verificaram que frangos alimentados com dietas suplementadas com vitamina E pode levar a um aumento no tempo da glicólise, aumentando a estabilidade das membranas mitocondriais, impedindo a liberação dos íons de Ca^{+2} , influenciando nas propriedades funcionais da carne. A vitamina E é um antioxidante que se associa à membrana, possuindo um efeito endógeno na carne, aumentando a concentração de α -tocoferol nos fluidos e integridade da membrana. Dietas suplementadas com vitamina E possuem um efeito benéfico inibindo o desenvolvimento da condição PSE e conseqüentemente causando um melhoramento nas propriedades funcionais, como, perdas por gotejamento, desnaturação protéica, capacidade emulsificante, estabilidade da cor, entre outras. A vitamina E atua na inibição da oxidação lipídica e atrasa a formação da metamioglobina. Foi observado em suínos que a dieta com vitamina E inibe a atividade enzimática da fosfolipase A_2 e conseqüentemente as cadeias longas de ácidos graxos insaturados não são liberados nas membranas (CHEAH et al., 1995).

Uma outra maneira de verificar a incidência de carne PSE é através da atividade enzimática da fosfolipase A_2 (PLA_2). A PLA_2 é uma enzima lipolítica que catalisa a hidrólise da posição sn-2 dos glicerofosfolípidios das membranas e geralmente liberam ácidos graxos, lisofosfolípidios, diacilglicerol e/ou ácido fosfatídico (ROUET-MAYER et al., 1995; MURAKAMI e KUDO, 2002). As PLA_2 participam da liberação do ácido araquidônico (AA) das membranas das células, conduzindo aos vários tipos de precursores de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas e leucotrienos (MURAKAMI e KUDO, 2002). Nürnberg et al. (2003) observaram diferenças na composição de ácidos graxos n-3

polinsaturados e concluíram que um aumento na taxa de oxidação lipídica contribui para modificações na qualidade da carne de suínos susceptíveis a hipertermia maligna. Supõe que a enzima PLA₂ representa um papel importante na ocorrência desta síndrome em aves verificando que sua atividade aumenta conforme o avanço da idade. Soares et al. (2003) realizaram um estudo para a verificação da atividade da fosfolipase A₂ em aves de corte estressadas pelo calor, e os valores de pH_{15 min}, capacidade de retenção de água, valores de L* encontrados foram típicos de carne PSE. Esta atividade enzimática é estimulada na presença dos íons de Ca⁺² e age primeiramente no fosfolípido da membrana mitocondrial resultando na formação de cadeias longas de ácidos graxos insaturados (SOARES, 2003).

Nos primeiros estudos em nossos laboratórios realizados com 28 frangos de 42 dias de idade submetidos a um estresse pré-abate, os mesmos foram colocados durante 1 hora sob uma temperatura de 42° C e comparados com um controle em condições ideais de abate, verificou-se na carne de peito das aves estressadas o desenvolvimento de carne PSE. O valor do pH zero hora *post-mortem* foi de 5,8 para o PSE e 5,98 para o normal, atingindo o valor constante de 5,20 após 15-20 minutos para os primeiros e 5,40 após 30-35 minutos para as aves normais. Essa diferença de valores reflete a rápida glicólise em PSE em relação ao normal, provocando problemas tecnológicos já conhecidos em suínos (OLIVO et al., 1998).

A incidência da qualidade PSE em carne de peito de frango varia de 2 a 20%, dependendo da condição ambiental (LAACK et al., 2000; SOARES et al., 2003). A condição PSE em suínos e perus é primeiramente resultado da desnaturação protéica (LAACK et al., 2000).

3.3.1 Parâmetros de Classificação para Carne PSE em Aves

Existe uma variabilidade da cor do peito da carne de ave, levando a uma classificação em três grupos: análogo ao DFD, *dark* (escuro), *firm* (firme) e *dry* (seco), normal e PSE. Essa variabilidade na coloração pode ser oriunda às práticas de manejo pré-abate a que são submetidas as aves. A cor da carne do peito de aves pode ser mensurada pelo sistema CIELAB (SOARES et al., 2002). Em um estudo realizado por Soares (2003) para a implementação do parâmetro de cor em filés de frango verificaram-se que o valor de L^*_{24h} e do pH é um parâmetro adequado para tal classificação. Portanto, filés com $L^* < 44,0$ são considerados DFD, $L^* > 53$ como PSE e $44,0 \leq L^* \leq 53,0$ como normal. Existe uma correlação entre os valores de pH e L^* , indicando que quanto menor o valor de pH maior será a luminosidade (L^*) dos filés, ou seja, em valores de pH abaixo de 5,8 e de cor o valor de L^* acima de 52 (McCURDY et al., 1996; BARBUT, 1998). Soares (2003) encontrou uma incidência de 5,95% para DFD, 15,86% para PSE e 78,19% para normal nas aves estudadas. Estas medidas são técnicas rápidas e não destrutivas, proporcionando indicações sobre a qualidade das propriedades funcionais em filés de frango.

3.4 RIANODINA

A rianodina é um alcalóide vegetal (*Ryania speciosa*) e atua como um dos agentes que induzem a liberação dos íons de Ca^{+2} . A rianodina é recepcionada por uma proteína intracelular receptora de rianodina (RYR). É uma proteína homotetramérica

composta de subunidades polipeptídicas de 565 KDa que fazem parte do canal de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático presente nos tecidos musculares e não musculares (FUJII et al., 1991; FILL e COPELO., 2002). Acredita-se que esta proteína é idêntica a proteína de ligação conhecida como PPU (proteína de ponto de união) denominada assim pela sua morfologia e localização na união das tríades (LAWRIE, 1998). Forma um componente importante do complexo liberador de cálcio que controla a contração muscular no músculo esquelético. No mecanismo de excitação-contração do tecido muscular as invaginações do sarcolema (túbulos “T”) que formam junções com as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático transmitem o impulso excitador (despolarização). Os receptores de rianodina (RYR) interagem com os receptores de dihidropiridina (DHPR). A DHPR funciona como um sensor ativando a RYR. Nesse momento o canal da RYR se abre e permite que o cálcio previamente capturado na proteína calsequestrina seja liberado no mioplasma, induzindo a contração muscular (SUTKO e AIREY, 1996; LAWRIE, 1998; DULHUNTY et al. 2002; FILL e COPELO, 2002; SMITH, 2003).

No músculo vivo, a concentração dos íons de Ca^{+2} no sarcoplasma é controlada por sistemas enzimáticos, reguladores da concentração de cálcio, localizadas no sarcolema (incluindo os túbulos “T”), na membrana do retículo sarcoplasmático e na membrana mitocôndrial (RÜBENSAM, 2000).

Nos mamíferos há três isoformas geneticamente distintas da rianodina: RYR1 predominante no tecido muscular esquelético, RYR2 presente no tecido cardíaco e a RYR3 no tecido cerebral. Existem traços da RYR1 no cérebro e a RYR3 pode estar distribuída em vários tecidos, como o esquelético e ser co-expressada juntamente com a RYR1 e com a RYR2 em outros tecidos. No músculo esquelético dos mamíferos a RYR3 pode apresentar concentrações de 20 a 50 vezes menor do que a tipo RYR1 (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; OGAWA et al., 2000).

O desenvolvimento da carne PSE em suíno acontece quando ocorre uma mutação na posição 1843 de uma base C (citosina) para uma base T (timina), no gene que codifica esta proteína, resultando na substituição de um resíduo de arginina (Arg) na posição 615 da seqüência normal da proteína para um resíduo de cisteína (Cys) na seqüência mutante, ocorrendo então uma mutação “*mis-sense*” (FUJII et al., 1991, MICKELSON e LOUIS, 1996). A Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) é uma técnica que permitiu identificar o ponto de mutação do gene que codifica para o receptor de rianodina do canal de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático da célula muscular, e assim distinguir três genótipos (FUJII et al., 1991, HOUDE e POMMIER, 1993, MICKELSON e LOUIS, 1996). O gene rianodina 1 (*ryr1*) foi estabelecido como o gene suspeito da Hipertemia Maligna de suínos, este gene foi mapeado na mesma região do cromossomo 6 que contém o grupo ligado ao gene *HAL* (HARBITZ et al., 1990). Estudos identificaram no retículo sarcoplasmático do músculo esquelético, o gene (*ryr1*) de liberação dos canais de Ca^{2+} como sendo a posição defeituosa. A mutação nesta proteína resulta em alterações no acoplamento excitação-contração levando a distúrbios na liberação do Ca^{2+} pelo elevado consumo de glicogênio e mudanças secundárias na estrutura e função do músculo suíno (FUJII et al., 1991; MICKELSON e LOUIS, 1996).

Os mecanismos responsáveis pelo problema PSE na carne de frango ainda não estão esclarecidos, podem estar relacionados com defeitos no gene codificador da proteína receptora de rianodina. O gene receptor de rianodina é altamente conservado entre as espécies (suínos, coelhos, humanos, ratos e espécie de aves) e a ocorrência da mutação encontrada em suínos pode ser similar em aves. As semelhanças entre as seqüências de rianodina de humanos e aves é de aproximadamente 82% (McKEE e SAMS, 1998). Ottini et al. (1996) verificaram a existência de duas isorformas (α -*ryr* e β -*ryr*) de receptores de rianodina no músculo esquelético de frangos que possuem homologias aos mamíferos. Os seqüenciamentos parciais

obtidos dos genes *ryr1* (2000 pares de base) e *ryr3* (15.089 pares de base) nos frangos estudados apresentaram semelhanças de 79,1% e 72,6%, respectivamente aos mamíferos. A *ryr1* e a *ryr3* foram expressas em diferentes níveis em vários tecidos no frango, principalmente nos músculos do peito, coxa e cérebro (Figura 1).

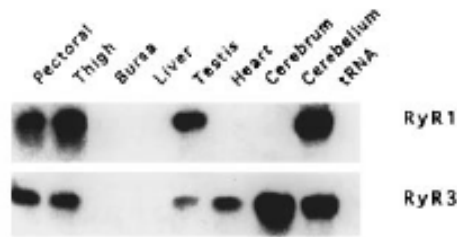
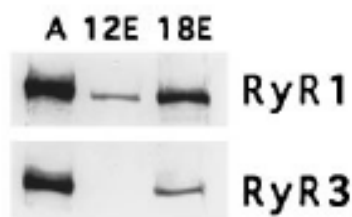


FIGURA 1 – mRNA da *ryr1* e *ryr3* nos tecidos de frango (OTTINI et al., 1996)

As isoformas *ryr1*(α -*ryr*) e *ryr3* (β -*ryr*) estudadas foram expressas no tecido muscular de embriões e no frango adulto (Figura 2) (OTTINI et al., 1996).

FIGURA 2 – Análise de Western-blot das proteínas - (A: músculos do peito de frango adulto;



12E: embrião de frango com 12 dias; 18E: embrião de frango com 18 dias) (OTTINI et al., 1996).

3.5 A Genética e a Indústria Avícola

A interação entre a indústria avícola com a genética e a nutrição, surgiu em 1977 quando os geneticistas sentiram que deveriam trabalhar junto com os nutricionistas e vice-versa, dada a velocidade de crescimento do frango de corte e da produtividade das poedeiras comerciais. Em conjunto, ambos poderiam estabelecer as exigências nutricionais da

ave, face ao melhoramento genético. Por outro lado, têm procurado melhorar o ambiente para as aves, através de condições de conforto que possibilitem produção mais econômica (CASTRO, 2001).

O avanço representado pelas chamadas linhagens de conformação, obtido por métodos convencionais de melhoramento genético, permite a indústria avícola trabalhar com frangos de maior rendimento de carcaça, com valorização de partes nobres, como o peito. Nos últimos trinta anos o frango de corte necessitava o dobro do tempo para atingir o peso ideal para o abate. A engenharia genética tem demonstrado seus progressos científicos, considerando que em um futuro próximo oferecerá aplicações práticas no dia-a-dia (NAKAMAE e PARAGUAÇU, 2001).

O uso de marcadores genéticos para identificação direta do genótipo, sem que haja interferência do meio ambiente é muito importante na seleção para características que tenham baixa herdabilidade e que se mostrem difíceis ou dispendiosas em sua mensuração, como a composição de carcaça, a susceptibilidade ao estresse, resistência a doenças e outras (NAKAMAE e PARAGUAÇU, 2001; COUTINHO, 2003). O mapa genético do frango possui marcadores distribuídos a intervalos regulares ao longo de todos os cromossomos, o que permite realizar estudos para identificação de genes de importância comercial. A possibilidade de combinação de um possível controle por esses novos meios representarão uma mudança de enorme impacto econômico na atividade (NAKAMAE e PARAGUAÇU, 2001).

Atualmente, três estratégias vêm se destacando na identificação de genes de interesse: a) mapeamento de QTL (“*quantitative trait loci*” – uso de famílias que estejam segregando para características fenotípicas de interesse, no uso de marcadores moleculares para relacionar regiões genômicas com características fenotípicas), b) estudo de genes candidatos (seleção de um gene de interesse com base em conhecimento de fisiologia,

bioquímica, doenças genéticas ou estudo de deleção gênica) e c) estudo de expressão diferencial por arranjos de alta densidade (baseiam-se na hipótese de que organismos com características fenotípicas diferentes apresentam expressão diferencial em genes relacionados com esta característica) (COUTINHO, 2003).

Através da genética é possível identificar, isolar, multiplicar e incorporar os genes de animais que codificam características desejáveis (LAWRIE, 1998). A tecnologia do DNA recombinante é moderna, de base científica, com importante potencial para aumentar a produtividade agrícola, reduzir o impacto ambiental da agricultura e melhorar a qualidade nutricional e tecnológica dos alimentos (LAJOLO e NUTTI, 2003). Devido ao grande potencial das técnicas do DNA recombinante relacionados aos animais produtores de carne, muitos estudos se dirigem ao mapeamento do genoma completo de ovelhas, suínos, bovinos e aves, para identificar o desenvolvimento de massa corporal, morfologia muscular e diversos atributos que envolvem a qualidade da carne (LAWRIE, 1998).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos o desenvolvimento experimental procedeu-se em duas etapas:

4.1 ETAPA 1

A primeira etapa do trabalho foi desenvolvida na Embrapa Suínos e Aves/SC e na Embrapa Soja/Londrina. Foram estudados o seqüenciamento de regiões codificantes para o gene receptor de rianodina tipo 3 em uma população de frango desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves.

4.1.1 Matéria-prima

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de frangos da população referência para mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) (LEDUR et al., 2002) abatidos com 41 e 45 dias de idade em abatedouro experimental na Embrapa Suínos e Aves de Concórdia/SC. As etapas de criação, abate e extração do DNA foram realizadas pelo Dr. Jorge Antônio Ferreira Lara.

Os frangos utilizados no experimento foram provenientes do cruzamento entre duas linhagens com genótipos diferentes, desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves. Uma linhagem de frangos de corte (P1), que possuem alta taxa de crescimento, com uma linhagem de aves de postura (P2), que apresentam baixa taxa de crescimento. Do cruzamento obtido, avançou-se gerações até o F3, cuja população foi utilizada neste trabalho. A população F3 foi dividida em dois grupos: controle e estressado. O jejum hídrico para ambos os grupos foram de aproximadamente 7 horas. No controle as aves foram transportadas por um tempo de 10 minutos em rodovias conservadas e abatidas aproximadamente 10 minutos após a chegada. No grupo estressado o transporte das aves foi de aproximadamente 30 minutos em rodovias de baixa qualidade apresentando pedras e buracos e após foram submetidas a uma temperatura constante de 40°C por 60 minutos em um ambiente fechado, conforme sugestão de Olivo (1999). O objetivo desta exposição ao calor foi induzi-las ao estresse e possivelmente aumentar a viabilidade das respostas fisiológicas. As aves foram abatidas e as amostras de sangue total coletadas assepticamente. A caracterização da carne PSE deu-se pela mensuração de dois parâmetros, o valor de pH, considera PSE para os valores abaixo de 5,8 e o valor colorimétrico L* valores iguais ou maiores que 53,0 (BARBUT et al., 1997a). Na determinação da carne PSE foram utilizadas amostras do músculo *Pectoralis major* (peito de frango).

4.1.2 Extração do DNA

Foram coletadas 28 amostras de sangue total de 1497 aves abatidas da população F3, sendo 14 provenientes de aves que não originaram carne PSE (Controle) e 14

de aves que originaram carne PSE, pelos valores de pH e L*. Em seguida foram adicionados EDTA nas amostras de sangue, como anticoagulante para a extração de DNA. No processo de extração de DNA foi utilizado o reagente DNAzol[®] (Gibco, Co), composto de uma solução de lise celular com detergente tiocianato de guanidina. O protocolo de extração foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.3 Seleção das regiões gênicas para estudo e desenho dos *primers*

Os hipotéticos *exons* foram encontrados a partir da comparação entre seqüências de Rianodina tipo 3 (RyR3) de *Gallus gallus* (*GenBank* N° acesso X95267, mRNA) e *Homo sapiens* (*GenBank* N° acesso AJ001515 gi:22057016, região codificadora completa do gene *ryr3* humano – cromossomo 15) que encontram-se disponíveis no *GenBank* (NCBI – *National Center of Biological Information*). Os *primers* foram desenhados para domínios específicos do gene receptor de *ryr3* (Figura 3) descritos para frangos (*GenBank* N° acesso X95267, mRNA). As duas seqüências de *ryr3* foram alinhadas com o apoio de programas de alinhamento local (*BLAST 2 sequences*, ALTSCUL et al.,1990) possibilitando a localização e delimitação aproximada de *exons* conservados entre as duas espécies. O objetivo desta abordagem foi eliminar a presença de seqüências de *introns* durante a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), pois se tem apenas o conhecimento prévio de seqüências de cDNA do gene *ryr3* (15.089 pares de base) de *Gallus gallus* no *GenBank* provenientes do trabalho de Ottini et al. (1996). Foram utilizadas as informações da seqüência completa do gene *ryr3* disponível de humanos para a identificação dos possíveis

exons. As regiões dos *exons* obtidas foram submetidas ao programa *OMIGA*[®] 2.0 para desenho de *primers* (Tabela 1).

O Domínio *pfam* 01365.8 é considerado um sítio ativo para o controle do fluxo de cálcio na proteína receptora do inositol trifosfato (proteína IP₃). Este domínio ainda não foi comprovadamente relacionado com sítios ativos em RYR3, mas possuem semelhanças de funções, podendo o *pfam* 01365.8 ser um importante sítio ativo para RYR3 e desse modo influenciar nas funções da proteína em aves. Foram desenhados dois conjuntos de *primers* para dois *exons* hipotéticos deduzidos para o domínio 1 e um conjunto de *primer* para o domínio 2 do gene *ryr3* (Figura 4). Os *primers* desenhados não cobriram a totalidade dos *exons* hipotéticos que foram estudados, respeitando-se a eficiência dos mesmos. Outros fragmentos já foram estudados no gene *ryr3* pelo Dr. Jorge Antônio Ferreira Lara da equipe do Professor Massami Shimokomaki (Figura 4).

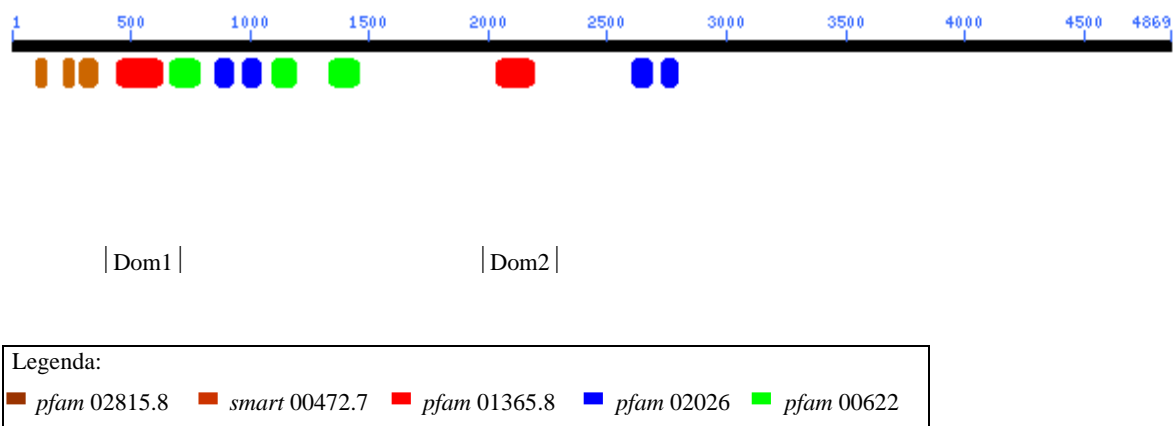


FIGURA 3 – Domínios Conservados do gene receptor de rianodina tipo 3 em *G. gallus* (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*)

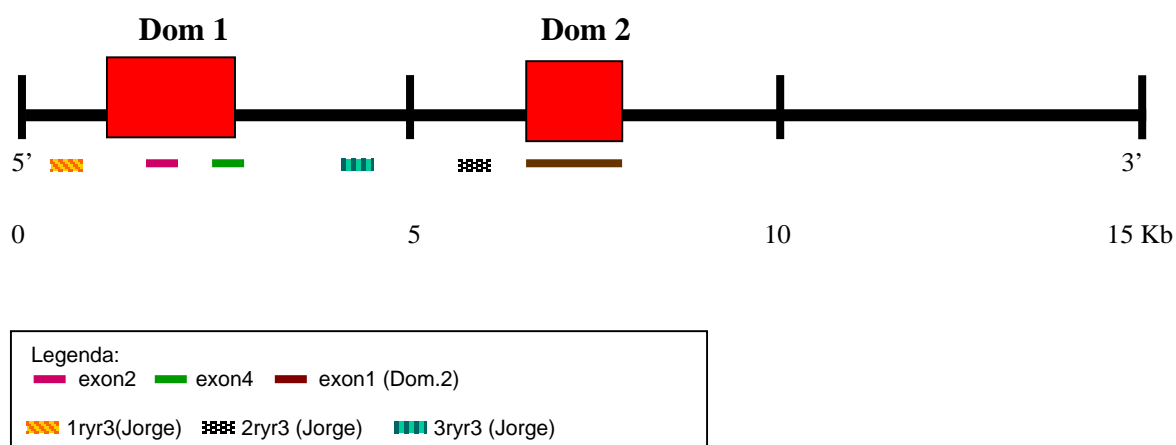


FIGURA 4 – Diagrama esquemático dos fragmentos estudados do gene RyR3. A linha contínua representa o tamanho da molécula de cDNA de RyR3 e as linhas menores, abaixo, indicam os fragmentos estudados.

TABELA 1 – *Primers* selecionados para *exons* hipotéticos que compreendem os domínios 1 e 2 em rianodina tipo 3 (RyR3) em frangos:

<i>Exon</i>	<i>Dom.</i>	<i>Posição no Gene RyR3</i>	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>	<i>Tam (pb)</i>
2	1	1511 a 1644	GGGAATGCTGGCACTAGT	GCAGTTCGTAAAGGAGATTTAA	134
4	1	1861 a 1989	AGGTTCTTGACGTGCTTT	CATCATTAAATCAAACGTGTTT	129
1	2	6147 a 6531	CTGGGCCAAATTCGCTC	GCCTCTGTAATGGACAACAATG	384

4.1.4 Amplificação

As amostras de DNA foram amplificadas por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (SAIKI et al., 1988). Das 28 amostras de sangue das quais extraiu-se o DNA foram escolhidas 20 delas ao acaso para serem amplificadas e clonadas. As reações de amplificação foram feitas no termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System-9600), sendo o volume final da reação de 20 μ L colocado em microtubos de 200 μ L (Tabela 2).

TABELA 2 – Concentrações e volume dos reagentes empregados na PCR

Reagente	Concentração inicial (estoque)	Concentração final por μL	Volume (μL)
Água Autoclavada	-	-	12,1
Tampão TE	10 X	1X	2,0
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,6
d NTPs	2,5 mM	0,2 mM	1,6
<i>Primer Forward</i>	50 μM	2,5 μM	1,0
<i>Primer Reverse</i>	50 μM	2,5 μM	1,0
DNA amostra	30 ng/ μL	2,2 ng	1,5
Taq DNA Polim.	5U	1U*	0,2

* Concentração final por reação (20 μL).

A temperatura de anelamento utilizada para os hipotéticos *exons* 2 e 4 estudados foi de 57°C. As demais temperaturas de amplificação utilizadas na reação de PCR foram: 3 minutos a 94 °C para desnaturação da fita de DNA, seguido de 38 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento 57°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 7 minutos (polimerização).

4.1.5 Separação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (1 %). Para a preparação do gel, foram pesados 2,5 g de agarose, diluindo-se em 250 mL de tampão TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) 1X e acrescentado 3 μL de brometo de etídeo (o brometo de etídeo se incorpora a molécula de DNA permitindo a visualização das bandas sob exposição à luz ultra-violeta (UV)). Foram pipetados 10 μL de cada produto de PCR e adicionado 2 μL de tampão de corrida e em seguida aplicados ao gel devidamente

posicionado em uma cuba para eletroforese a 5 V/cm e imerso em solução TBE 1X. A eletroforese foi realizada a 120 V por aproximadamente 2 horas e 40 minutos. Após a corrida o gel foi exposto a luz UV para visualização das bandas e os resultados foram registrados e digitalizados pelo sistema KODAK *Electrophoresis Documentation and Analysis System* (EDAS) 290 (*Eastman Kodak Company, New Haven*). As bandas foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi e acondicionadas em micriotubos de 1,5 mL. O tamanho das bandas foi estimado com o emprego de uma *ladder* de 100 pares de base (Gibco, Co.).

4.1.6 Separação e Purificação das Bandas

As bandas escisadas foram submetidas à purificação utilizando-se o Kit *Sephaglass*[®] seguindo as instruções do fabricante (*Amersham Biosciences*). A cada microtubo foi adicionado 250 µL de solução solubilizadora misturando-se em vortex, e em seguida os tubos foram colocados a 60°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados 5 µL de solução *Sephaglass*[®] a cada amostra, misturando com o auxílio do vortex e deixado em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 r.p.m (11.750 g) por 30 segundos, removendo cuidadosamente o sobrenadante. Após adicionou-se 80 µL de *Washer Buffer*, para a lavagem, ressuspendendo o *pellet* com auxílio de uma pipeta, em seguida centrifugou-se a 12.000 r.p.m (11.750 g) por 30 segundos à temperatura ambiente, removendo-se o sobrenadante. O processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes totalizando 3 etapas de lavagem. Os microtubos foram deixados em repouso por 10 minutos e adicionou-se 20 µL de água ultra pura, ressuspendendo-se gentilmente o *pellet* e deixando-se por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação periódica. Os tubos foram novamente

centrifugados (12.000 rpm) por 1 minuto, à temperatura ambiente e cuidadosamente transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo.

4.1.7 Clonagem

Os fragmentos de DNA extraídos e purificados das bandas foram inseridos no vetor de clonagem pGEM-T *Easy Vector* (Promega Corp.) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O plasmídeo pGEM-T *Easy Vector* é um vetor plasmidial linearizado com extremidades coesivas, tendo uma timina (T) no final 3' de ambas as fitas. Essas timinas únicas, fita simples projetam-se na extremidade 3' favorecendo a inserção de produtos de PCR no local, aumentando a eficiência da ligação, uma vez que a maioria das enzimas Taq polimerases adicionam adeninas (A), fita simples, na extremidade 3' dos produtos de PCR (Figura 5). O vetor pGEM-T *Easy Vector* também contém a origem de replicação f1 e pode ser usado em produção de fita simples de ssDNA (DNA fita simples).

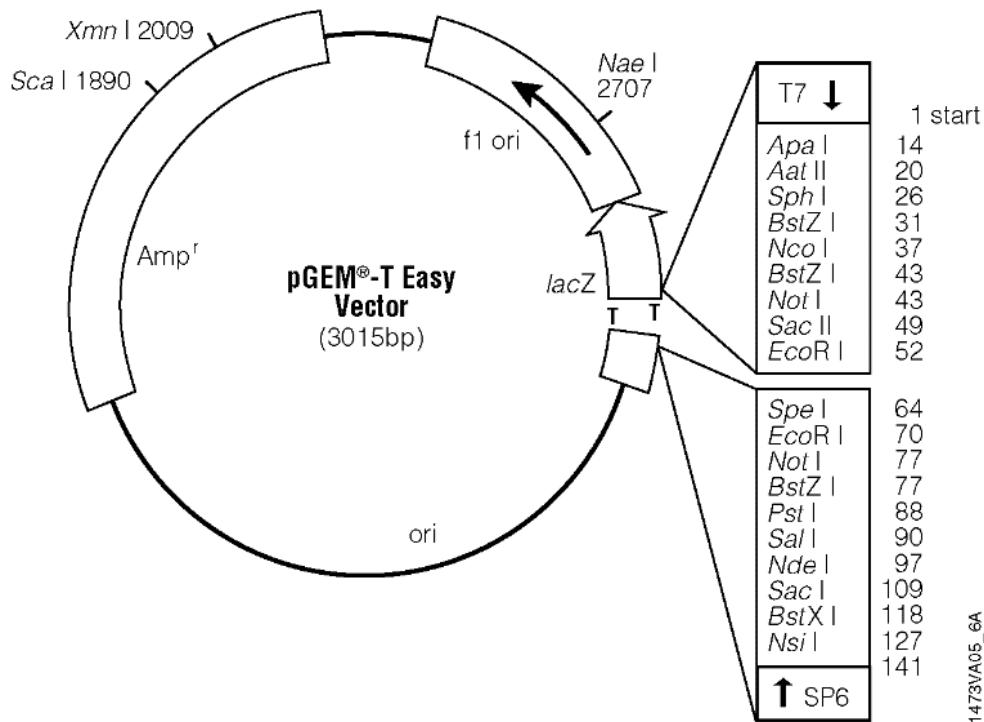


FIGURA 5 – Esquema de construção gênica do plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega Corp)

4.1.7.1 Reação de Ligação

Na reação de ligação foram utilizados os seguintes reagentes: 5 μ L de tampão DNA ligase 2 X; 0,5 μ L de T4 DNA ligase; 0,5 μ L de pGEM-T (50 ng) e 4,0 μ L de produto de PCR. A reação de ligação foi realizada em um microtubo de 200 μ L, e o sistema foi incubado a temperatura de 4 °C por 16 horas (*overnight*).

4.1.7.2 Eletroporação e plaqueamento de células competentes

Os plasmídeos com os fragmentos inseridos foram utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* (cepa DH10-B). Foram adicionados em um microtubo (0,5 mL) 1 µL da reação de ligação e 39 µL de células competentes de *E. coli* (DH-10B), em seguida as amostras foram eletroporadas no equipamento Eletroporador Micropulse (*Bio Rad*) ajustado para 2,5 KV e controlador de pulso 200 Ω (AUSUBEL et al.,1995). Após a descarga elétrica foram adicionado às amostras 1,0 mL de meio de cultura *SOC* previamente preparado e acondicionado em tubos de centrífuga de 15 mL com tampa rosqueável. Os tubos foram incubados a 37°C por 60 minutos sob agitação constante. Posteriormente foram transferidos 200 µL de meio *SOC* contendo as células de *E. coli* transformadas e não transformadas para placas de Petri contendo o meio de cultura, ágar LB com ampicilina adicionado de 10 µL de X-GAL(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) e 50 µL de IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside). Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

A identificação dos clones recombinantes deu-se pela coloração das colônias. O local de inserto no vetor de clonagem, inativa a região codante para um α-peptídeo, componente da enzima β-galactosidase, comprometendo a atividade da mesma. As colônias que recebem o inserto ficam com uma coloração branca enquanto as colônias sem o inserto ficam azuis, quando cultivadas em meio de cultura que contenha IPTG e X-Gal. O IPTG serve de substrato para a enzima β-galactosidase, cujo produto da reação enzimática, na presença de X-GAL adquire coloração azulada, e na ausência da enzima não há alteração de cor.

A resistência a ampicilina no vetor é um outro fator de seleção das células transformada e não transformada, pois a *E. coli* é sensível ao antibiótico ampicilina sendo que a resistência é adquirida através do plasmídeo pGEM-T.

4.1.8 Extração do DNA plasmidial

A extração dos plasmídios foi realizada conforme Sambrook et al. (1989), pelo método em microplacas que foi compatível e indicado para o equipamento usado no seqüenciamento, ABI 3100 (Applied Biosystems, E.U.A).

As microplacas consistem de 96 poços. A cada poço foi adicionado 1 mL de meio de cultura *Circle Grow* (CG) contendo 100 µL/mL de ampicilina e foram inoculadas as colônias brancas individualmente com auxílio de palitos de madeira esterilizados. Aproximadamente oito colônias transformadas foram selecionadas para cada fragmento expresso. Após inoculação a microplaca foi selada com adesivo e pequenos furos foram feitos com auxílio de uma agulha flambada para permitir a aeração. As placas foram incubadas a 37°C por 16 a 18 horas.

Após incubação, as microplacas foram submetidas à centrifugação a 4.000 rpm (1.310 g) por 6 minutos à 10°C. O sobrenadante foi descartado e a microplaca invertida em um papel absorvente por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se a cada poço 200 µL de uma solução de ressuspensão celular (*cell resuspension solution*) contendo glicose, EDTA e Tris-HCl (solução GET). Os poços foram novamente selados e agitados vigorosamente por 2 minutos com auxílio do vortex. Em seguida a microplaca foi centrifugada a 4.000 rpm por 9 minutos à 10°C para a sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e a placa

invertida em papel absorvente por 5 minutos. Adicionou-se a cada poço 65 μL de uma solução de lise celular (*cell lysis solution*) contendo 6 mL de solução GET e 250 μL de RNase A (20 mg/mL). Todo o material foi transferido para uma nova microplaca de fundo em U e então acrescentou-se em cada poço 65 μL de uma solução de NaOH 0,2 N/SDS 1% (*neutralization solution*), a placa foi selada e invertida manualmente de 5 a 10 vezes. O sistema foi incubado por 10 minutos em gelo e centrifugado (4.000 rpm) por alguns segundos. Posteriormente foram adicionados 60 μL em cada poço de acetato de potássio 3M e a placa selada com adesivo e agitada 10 vezes por inversão. Em seguida foi incubado por 10 minutos em gelo e centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos à 4°C.

Uma placa *Millipore* (MAGV N22) foi fixada em uma microplaca em fundo V, e transferiu-se 100 μL do sobrenadante obtido na microplaca em U. Após foi centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos à 4°C até que todo o volume foi filtrado para a microplaca em fundo V. A placa de *millipore* foi removida e descartada e pipetou-se 80 μL de isopropanol (Merck) ao filtrado, centrifugado a 4.000 rpm, por 45 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados a cada poço 150 μL de etanol 70% (Merck, E.U.A.) e novamente centrifugado (4.000 rpm, 5 minutos, 4°C).

A microplaca foi invertida e deixada a temperatura ambiente por 60 minutos. As amostras foram então ressuspensas em 30 μL de água ultra pura e deixadas em repouso *overnight* a temperatura ambiente e depois foram armazenadas a -20°C para posterior seqüenciamento do DNA.

4.1.8.1 Digestão

Para confirmar a presença do inserto optou-se pela digestão prévia de alíquotas das amostras com a enzima de restrição *EcoRI*. Foram transferidos 5,0 µL dos plasmídios extraídos pelo método de microplacas para uma placa 96-wells contendo 10 µL de *mix* com a reação de transcrição. O *mix* foi preparado previamente e composto de 1,5 µL de tampão *React 3* (10X), 0,5 µL da enzima *EcoRI* (10U/µL), e 8,0 µL de água *MilliQ*. A reação foi incubada à 37 °C por 2 h.

4.1.8.2 Eletroforese

Após a digestão, foi adicionado 2,0 µL de tampão de amostra (Sacarose 40% e Bromofenol Blue 0,25%) em cada poço da placa. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % contendo 4,0 µL de brometo de etídio e procedeu-se a eletroforese em tampão TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) 1X, a 120 V (5V/cm) durante duas horas. Após a eletroforese os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

4.1.9 Seqüenciamento

4.1.9.1 Seqüenciamento por ciclagem térmica

Os plasmídios extraídos pelo método em microplacas foram submetidos a uma reação de PCR com o intuito de amplificar a região que contém o inserto que corresponde ao fragmento da seqüência de DNA do gene *ryr 3*. Foi utilizado o método PCR *cycle sequencing*, sistema *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit*, versão 2 (*Applied Biosystems Corp.*, Califórnia, USA). O *primer* utilizado foi o M13 (5´TGTAACGACGGCCAGT 3´) que inicia a amplificação em região próxima ao inserto no plasmídeo e assim permite a amplificação do fragmento de interesse.

Cada reação foi montada da seguinte forma: 3,7 µL de água destilada; 2,0 µL de solução *save money* (0,2M Tris-HCl pH 9 e MgCl₂ a 5mM) ; 2,0 µL de *mix terminator*; 0,8 µL de *primer* M13 (2 pmol/µL) e 1,5 µL de DNA. As temperaturas do ciclo de PCR foram: 96°C por 2 minutos mais 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

O *mix terminator* é composto por uma polimerase na presença dos quatro nucleotídeos que compõem o DNA (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), em menor quantidade que os 4 nucleotídeos participam da reação os dideoxynucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) marcados com diferentes corantes (diclororodaminas) que possibilitam a identificação do oligonucleotídeo que os contém, MgCl₂ e Tris-HCl pH 9,0.

4.1.9.2 Precipitação alcoólica do DNA

Após a reação de PCR as amostras amplificadas foram submetidas a precipitação alcoólica em placa. Foram então adicionados 80 μ L de isopropanol 75% a cada amostra e centrifugados a 4.000 rpm (1.310 g) por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente. Em seguida 100 μ L de etanol 70% foi aplicado e o sistema centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante novamente foi descartado e o *pellet* deixado secar a temperatura ambiente e protegido da luz.

4.1.9.3 Separação dos fragmentos amplificados

Após a precipitação do DNA, foi adicionado em cada amostra 10 μ L de formamida e as placas foram levadas ao termociclador a 95°C e imediatamente colocadas no gelo. O objetivo desse procedimento é promover nova desnaturação do DNA expondo as fitas da hélice melhorando a eficiência na leitura do seqüenciador.

A separação dos fragmentos de PCR marcados foi realizado em seqüenciador automático ABI 3100 (*Applied Biosystems*). As seqüências foram nomeadas conforme o nome da placa e posição do clone na mesma. Os cromatogramas foram submetidos ao tratamento pelo *software Phred* (EWING et al., 1998) atribuindo o valor de qualidade às bases. De cada seqüência, foi considerada útil a porção que apresentou pontuação *Phred* igual ou superior a 20. As partes do vetor *pGem* que permaneceram junto ao fragmento foram separadas do inserto pelo programa *CrossMatch* (<http://www.phrap.org>).

4.1.10 Análises dos Resultados

Inicialmente os resultados obtidos no seqüenciamento foram comparados entre si, discriminando os indivíduos que originaram carne PSE com relação aos considerados normais (Controle). Depois as seqüências foram submetidas à análise de similaridade com a seqüência de mRNA do gene *ryr3* de *Gallus gallus* (número de acesso X95267.1), utilizando o programa *BLAST 2 sequences* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/b12.html>).

4.2 ETAPA 2

A segunda etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório de análise físico-química do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da UEL e no laboratório de análise físico-química da Universidade Estadual de Maringá.

4.2.1 Matéria-prima

Foram utilizadas amostras de carnes com características normais (Controle) e carnes com características PSE (Estressado) obtidas de frangos comerciais da linhagem *Cobb* abatidos aos 45 dias de idade em frigorífico comercial.

4.2.2 Caracterização da Carne PSE

A caracterização da carne PSE deu-se pela mensuração de dois parâmetros, o valor de pH, considera-se PSE para os valores abaixo de 5,8 e o valor colorimétrico L* valores maiores que 53,0 (BARBUT, 1997a).

As medidas de cor foram realizadas na face ventral do filé de peito, tomando três leituras por amostra para a determinação de L*, com a utilização do aparelho Minolta® CR-10 calibrado para um padrão branco em ladrilho, conforme descrição de SOARES (2003).

O pH foi medido diretamente no músculo *Pectoralis major* pela inserção de eletrodo conectado ao potenciômetro Sentron 1001. O ponto de incisão do eletrodo foi na parte cranial-ventral do filé (BOULIANNE e KING, 1995). Os tempos de leitura de pH *post mortem* foram de 24 horas, sob temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. As medidas de pH foram analisadas nas mesmas amostras da determinação de L*.

4.2.3 Determinação do perfil de ácidos graxos

4.2.3.1 Extração dos lipídios

A extração dos lipídios foi realizada segundo a metodologia descrita por BLIGH e DYER (1959). Foram pesados em um béquer de 250 mL 30 g da amostra, em duplicata, homogeneizada em um multiprocessador. Após foram adicionados a amostra 90 mL de uma solução de clorofórmio e metanol (2:1 v/v) agitando-se por 2 minutos (*Polytron*). Em seguida, foram adicionados mais 30 mL de clorofórmio e 30 mL de água destilada e agitou-se novamente. O homogeneizado foi filtrado em funil de *Büchner* com papel de filtro (WHATMAN) nº 1 empregando vácuo.

O filtrado foi transferido para um funil de separação e foram adicionados solução aquosa de NaCl 0,9%, equivalente a 1/5 do volume do filtrado. Após a separação das fases, a fase inferior, contendo o clorofórmio e a matéria graxa total, foi recolhida em um balão

volumétrico de fundo chato. Com a utilização de um rotavapor, com temperatura controlada entre 33-34°C, o clorofórmio foi evaporado e a matéria graxa total separada.

4.2.3.2 Hidrólise e transesterificação dos triacilgliceróis

O preparo dos triacilgliceróis foi realizada conforme a metodologia 5509 da ISO (1978). Foram pesados aproximadamente 200 mg da matéria graxa obtida e transferidos para tubos de ensaio com tampas rosqueáveis de 10 mL. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de n-heptano a cada tubo de ensaio, agitando até a solubilização total da matéria graxa. Após, adicionou 2,0 mL KOH em metanol 2M e agitou-se vigorosamente a mistura durante 5 minutos. A solução foi deixada em repouso até a completa separação das fases. A fase superior contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, foi cuidadosamente pipetada e transferida para um microtubo de 1,5 mL e armazenada sob congelamento a -18°C até o momento da análise.

4.2.3.3 Cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos das amostras de carne de frango com e sem características PSE foi realizada no Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá. Os ésteres de ácidos graxos foram analisados através do cromatógrafo gasoso 14-A (Shimadzu, Japão) equipado com detector de ionização de chama e

coluna capilar de sílica fundida CP Sil-88, coluna capilar (100 m, 0,25 mm e 0,25 μm de cianopropil polisiloxano) foi programada temperatura da coluna a 10 K/min de 423 a 513 K. O ponto de injeção e detector foi mantido a 493 e 518 K respectivamente. Os fluxos dos gases (White Martins) foram de 1,4 mL.min⁻¹ para o gás de arraste (H₂); 30 mL.min⁻¹ para o make-up (N₂) e 30 mL.min⁻¹ e 300 mL.min⁻¹ para o H₂ e para o ar sintético da chama, respectivamente. A divisão usada era 1/100. A identificação dos ácidos graxos foi feita comparando os tempos de retenção relativa dos picos de FAME das amostras com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (*Sigma*), por co-eluição (“*spiking*”) de padrões junto com a amostra. As áreas de picos foram determinadas pelo CG-300 integrador (CG, Instrumentos Científicos, Brasil). Dados como porcentagens de área normalizadas dos ácidos graxos.

4.2.4 Análise estatística

Os resultados das medidas de pH e cor e determinação do perfil de ácidos graxos foram analisados utilizando o programa estatístico *STATISTICA for windows* versão 5.0 (STATSOFT, 1995). O teste *t* de *Student* foi aplicado para comparar as diferenças significativas entre as amostras de carne normal (Controle) e PSE (Estressado).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA 1

5.1.1 Extração do DNA

As amostras de DNA utilizadas foram extraídas de amostras de sangue de animais (n=1497) que apresentaram características de carne PSE e de animais que originaram carne normal (Controle). A classificação deu-se pela mensuração de dois parâmetros: cor pelo sistema CIELAB (L^*) e do pH (24 h *post-mortem*) (Tabela 3). A carne PSE foi considerada aquela que apresentou pH inferior a 5,8 e valor de L^* superior ou igual a 53,0, conforme Barbut (1998).

De acordo com Lara (2003) a incidência de PSE foi de 262 ocorrências em 742 amostras para o grupo controle (35,30%), com valores L^* e pH 24 horas *post mortem* médios de 52,25 ($\pm 3,38$) e 5,63 ($\pm 0,43$), respectivamente, e 270 ocorrências em 755 para o grupo estressado (37,08%), com valores médios de pH 5,62 ($\pm 0,14$) e valores L^* de 51,60 ($\pm 2,77$). As aves utilizadas no experimento foram provenientes do cruzamento de aves de corte (P1) e postura (P2) e em 35% do total de aves abatidas verificou-se a ocorrência de PSE (LARA, 2003). Fatores como manejo pré-abate, condições de transporte, dieta hídrica, descanso, temperatura ambiente, insensibilização antes da sangria influenciam na qualidade final da carne (OLIVO, 1999; GUARNIERI et al., 2002). Os resultados do valor de L^* e pH 24 horas *post mortem* obtidos por Lara (2003) demonstraram que os índices de PSE e carne normal

foram semelhantes entre os dois grupos, sugerindo que o transporte e a temperatura ambiente não foram significativos para a determinação de condições estressantes para as aves. Considerou-se que a incidência de PSE nos dois grupos de aves poderia estar relacionado com técnicas de manejo, retirada dos frangos do seu *habitat*, excessiva emissão de ruídos, ausência de insensibilização, ausência de descanso, entre outros fatores. Segundo Guarnieri et al. (2002) é importante um período de descanso na etapa que antecede o abate para reposição de glicogênio muscular que são perdidos durante a apanha e transporte dos animais. A classificação realizada por Lara (2003) dos indivíduos da população estudada (F3) deu-se então pela mensuração dos parâmetros de pH e L* 24 horas *post-mortem*. Foi possível a obtenção de uma amostragem significativa para a realização do trabalho, sendo selecionadas 20 amostras de DNA das aves abatidas (F3) para a amplificação e clonagem, provenientes de 10 indivíduos que não originaram carne PSE sendo considerados como controle e 10 indivíduos que originaram carne PSE de acordo com os parâmetros de pH e L*(Tabela 3).

TABELA 3 – Classificação das amostras de carne de frango Normal e PSE

Amostra	Controle		Amostra	PSE	
	pH (24 h)	L*		pH (24 h)	L*
1	5,84	45,8	11	5,62	54,3
2	5,92	43,2	12	5,46	55,0
3	5,82	47,4	13	5,55	56,5
4	5,87	47,7	14	5,50	60,6
5	5,87	48,1	15	5,64	58,1
6	5,92	47,6	16	5,46	59,1
7	5,77	47,8	17	5,55	59,2
8	5,56	53,0	18	5,45	56,0
9	5,80	48,9	19	5,71	55,3
10	5,76	44,7	20	5,42	59,4

LARA (2003)

5.1.2 Gene candidato estudado – *ryr3*

O gene receptor de rianodina pode ser considerado um gene conservado entre as espécies. Segundo McKEE et al. (1998) 82% deste gene em humanos é similar em aves. No tecido muscular esquelético das aves foram identificadas duas isoformas de receptores de rianodina, a isoforma α (α -RyR) e a isoforma β (β -RyR), que também estão presentes no tecido muscular de anfíbios e peixes (OTTINI, et al., 1996; SUTKO e AIREY, 1996; STRASBURG e CHIANG, 2003). Segundo Ottini et al. (1996) a isoforma α -RyR possui 79,1% de similaridade com a isoforma RyR tipo 1 e a isoforma β -RyR 72,6% de similaridade com a isoforma RyR tipo 3 de mamíferos. Durante o mecanismo de contração e excitação muscular do músculo esquelético em aves, a despolarização dos tubulos-T induz a liberação dos íons de Ca^{+2} pela via α -RyR que está fisicamente ligada a proteína diidropiridina (DHPR). O local de aumento da concentração dos íons de Ca^{+2} resulta na indução e liberação de Ca^{+2} pela via β -RyR que está localizada na periferia da junção dos tubulos-T/retículo sarcoplasmático, induzindo o músculo a contração muscular (Figura 6). No músculo esquelético das aves as duas isoformas α -RyR (RYR1) e β -RyR (RYR3) estão envolvidas no mecanismo de indução e liberação dos íons de Ca^{+2} , enquanto que nos mamíferos predominantemente o fluxo dos íons de Ca^{+2} é controlado pelos receptores de rianodina tipo 1 (RyR1) (Figuras 6 e 7) (STRASBURG e CHIANG, 2003).

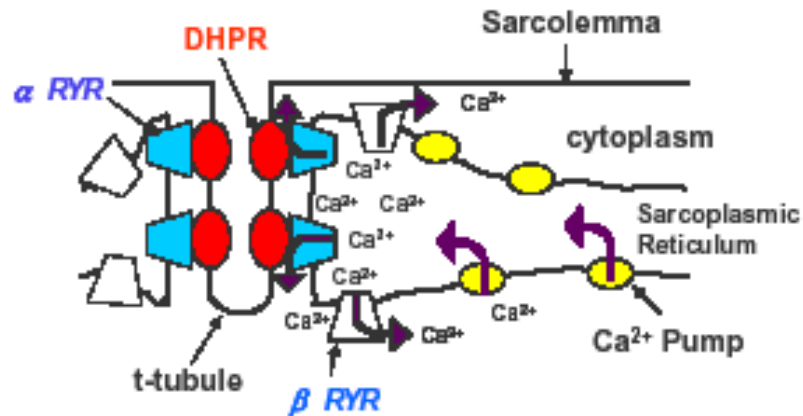


FIGURA 6 – Mecanismo de excitação-contração muscular do músculo esquelético de aves. A via α -RyR (azul) é induzida pela despolarização do tubulos-T a liberação dos íons de Ca^{+2} que está ligada a proteína diidropiridina (vermelho). A indução e liberação de Ca^{+2} se dá também pela via β -RyR (branco) que está localizada na periferia da junção dos tubulos-T/retículo sarcoplasmático. O Ca^{+2} é sequestrado durante o relaxamento muscular pelas bombas de Ca^{+2} (amarelo) (STRASBURG e CHIANG, 2003).

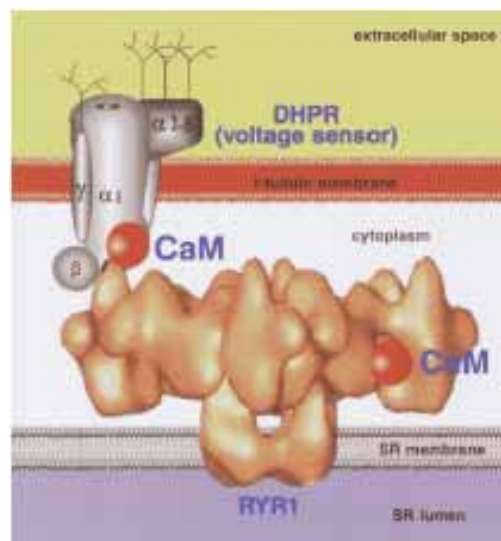


FIGURA 7 – Mecanismo de excitação-contração muscular do músculo esquelético de mamíferos. Um impulso nervoso percorre o túbulo T sendo captado pelo receptor diidropiridina, uma proteína heterotetramérica que ativa o canal da rianodina (RYR1). A porção da RYR1 que está no citoplasma se liga a calmodulina (CaM). Sob despolarização dos tubulos-T a DHPR sofre mudança na sua conformação e transmite a RYR1 que se abre permitindo que o Ca^{+2} previamente capturado pela calsequestrina seja liberado no citoplasma, induzindo o músculo a contração (STRASBURG e CHIANG, 2003).

Considerou-se o gene receptor de rianodina tipo 3 (*ryr3*) como o gene candidato para a procura de mutações no estudo da investigação do problema PSE, por este ser efetivamente expresso e estar relacionado com o processo de contração muscular em aves.

De acordo com as informações disponíveis no NCBI realizadas no trabalho de Ottini et al (1996) os dois domínios estudados presentes na proteína RYR3 são os mesmos existentes na proteína do inositol (IP_3), que também é responsável pelo fluxo de cálcio, sendo estes domínios sítios ativos da proteína onde eventuais mutações levariam a alterações nas suas funções normais, que poderiam interferir nas propriedades funcionais da carne.

Segundo Lara (2003) a estratégia de abordar um gene candidato para PSE é válida, na medida em que, uma mutação que leve a diferentes padrões de bandas no gel de agarose, ou que possam gerar *primers* de SNPs ("*Single Nucleotide Polimorphims*"), pode ser um método rápido na detecção do fenômeno. Em suínos diversos marcadores moleculares são utilizados nos sistemas de produção animal, como na detecção de animais com suscetibilidade ao estresse (genes Halotano e RN), resistência a doenças, entre outros (COUTINHO, 2003).

Supõe-se que a proteína RYR3 em frango contenha *exons* pequenos de aproximadamente 200 pares de bases, como o gene *ryr1* em humanos, o que dificultaria o estudo, pois teria que ser analisado pequenos fragmentos (*exons*). Lara(2003) verificou em seu estudo, durante a dedução de alguns hipotéticos *exons* em frango, que estes encontravam homologia nas seqüências disponíveis para os humanos, e principalmente o tamanho dos fragmentos obtidos eram semelhantes, entre frangos e humanos. No trabalho de Ottini et al. (1996) 15.089 pares de bases em mRNA foram sequenciados do gene *ryr3* para frangos (gi:1212911). Até o momento tem-se disponível a seqüência completa do gene *ryr3* em *Homo sapiens* através do cromossomo 15 (gi:22057016), mas ainda não foram deduzidos *exons* para o gene. Já no caso do gene *ryr1* em *Homo sapiens* todos os *exons* encontram-se disponíveis no *Entrez* (NCBI).

Conforme Lara (2003) outros genes candidatos além do *ryr3* podem ser investigados para o problema PSE em frangos, como o gene *ryr1*, o gene da enzima fosfolipase A_2 (SOARES, 2003) ou outras regiões exônicas do *ryr3* devem ser estudadas. A

investigação de genes candidados identificados por estudos genéticos ou fisiológicos podem contribuir na compreensão dos mecanismos funcionais que influenciam na qualidade final da carne. Identificar alterações genômicas que levem ao surgimento de características PSE, poderão gerar estratégias de controle que vão desde o uso de marcadores moleculares no melhoramento de animais até a geração de animais transgênicos com melhor qualidade de carne.

5.1.3 Seleção das regiões gênicas para estudo e desenho dos *Primers*

Os *primers* desenhados para os *exons* 2 e 4 pertencentes ao domínio 1 do gene *ryr3* (Figura 7), não cobriram a totalidade dos mesmos, mas apresentaram amplificação. Observou-se consistência na ocorrência das bandas relativas aos fragmentos estudados (Figura 8 e 9). As amplificações foram obtidas das amostras de DNA extraídas de indivíduos considerados normais (controle) e de indivíduos que originaram carne PSE, ou seja, 10 frangos normais e 10 frangos PSE, sendo, portanto, 10 repetições. A caracterização PSE foi de acordo com Barbut (1997) pela mensuração dos valores de pH e L* (Tabela 3). O tamanho dos fragmentos dos hipotéticos *exons* 2 e 4 foram de 134 e 129 pares de bases, respectivamente, conforme o esperado, pela localização de cada par de *primers* no gene *ryr3* em *Gallus gallus* (Nº de acesso X95267.1 – NCBI) em todas as amostras de DNA (PSE e Normal). A temperatura de anelamento utilizada para ambos os *exons* (2 e 4) foi de 57°C.

O par de *primer* desenhado para o segundo domínio (Hipotético *exon* 1 – Figura 7 e Tabela 1) da proteína RYR3 apresentou resultados insatisfatórios não ocorrendo a amplificação via PCR nas amostras de DNA analisadas, inviabilizando a continuação das

análises de clonagem e seqüenciamento. Considerou-se a possibilidade da existência de *introns* que dificultaram a eficiência do *primer*, não sendo possível a obtenção de resultados para este *exon*. Novos *primers* devem ser desenhados caso haja interesse em continuar o estudo desta região.

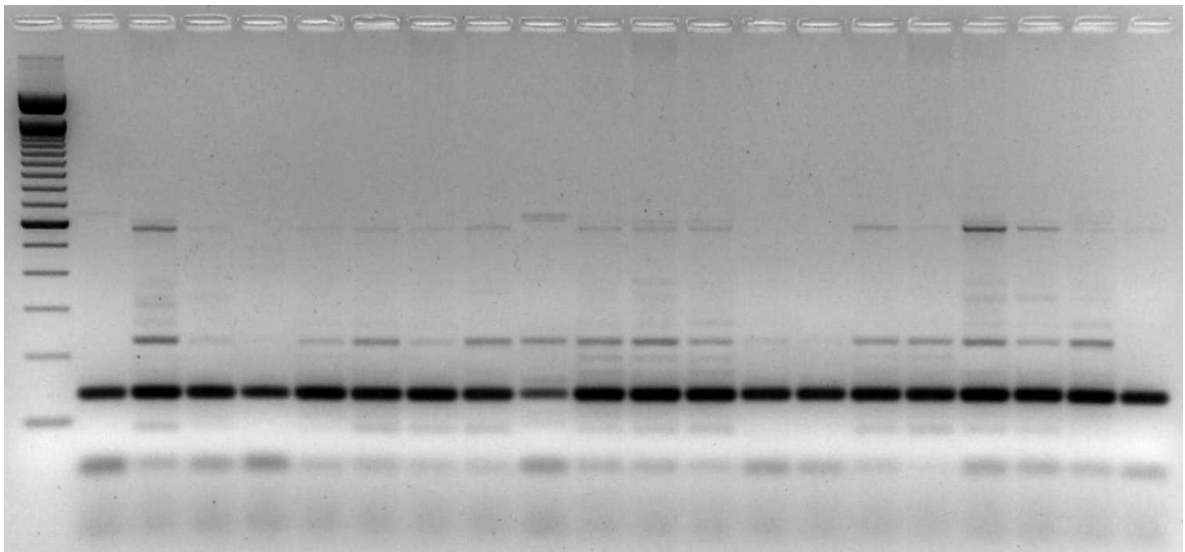


FIGURA 8 – Produtos de PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% do hipotético *exon 2*.

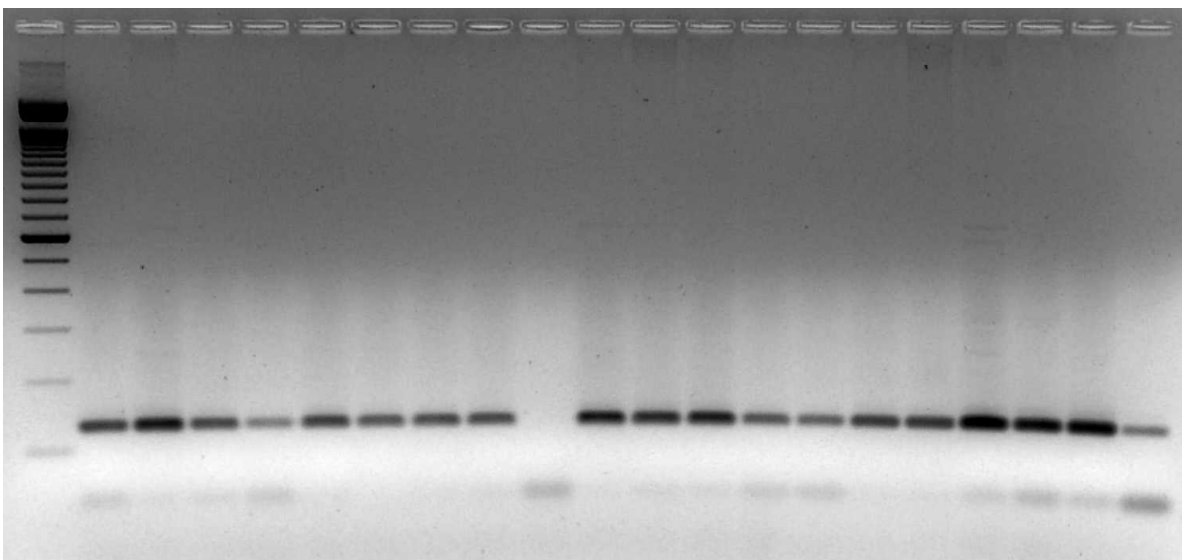


FIGURA 9 – Produtos de PCR submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% do hipotético *exon 4*.

5.1.4 Análise do Seqüenciamento e da estrutura primária dos fragmentos estudados no gene *ryr3*

As regiões amplificadas dos fragmentos analisados, Hipotético *exon 2* (domínio 1 *Pfam* 01365.8) e Hipotético *exon 4* (domínio 1 *Pfam* 01365.8), foram clonadas utilizando o vetor PGEM-T *Easy Vector* (*Promega Corp.*). Foram escolhidos de 1 a 4 clones do mesmo indivíduo para o seqüenciamento. No alinhamento dos cromatogramas obtidos, observou-se que algumas posições nucleotídicas variaram entre os indivíduos normais (Controle) e PSE estudados (Anexo A). Em ambos os fragmentos (*exons 2 e 4*) as seqüências do controle e dos animais PSE apresentaram aproximadamente 100 % de identidade com o gene *ryr3* em *Gallus gallus* (Nº acesso X95267.1), utilizando o programa *BLASTN* (*nucleotide-nucleotide blastn*) disponível no site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo B).

Foram observadas em algumas das seqüências do hipotético *exon 2* a ocorrência de 14 mutações de ponto, a presença de 2 Gap (deleção de bases) e uma inserção de uma base, em indivíduos e posições distintas e alguns indivíduos apresentaram mutações em diferentes posições e clones (Figura 10). Na posição 1610 do gene *ryr3* (*G. gallus*) apresentou uma guanina (G) no lugar de uma adenina (A). Esta mutação foi observada em três indivíduos, dois provenientes do controle (2 e 10) e um dos indivíduos PSE (20), não resultando em modificações na estrutura primária dos polipeptídeos. Na posição 1542 do gene *ryr3* apresentou uma adenina (A) no lugar de uma guanina (G) em dois indivíduos diferentes, um normal (3) e um PSE (16), e ocorreu uma alteração no resíduo de aminoácidos no polipeptídeo traduzido na posição 489 do gene *ryr3*, uma asparagina (Asn) no lugar de um ácido aspártico (Asp). Em dois clones obtidos do seqüenciamento do indivíduo 1 pertencente

ao controle apresentaram mutação na posição 1599, uma guanina (G) no lugar de adenina (A), alterando o resíduo de aminoácido na posição 508 do polipetideo traduzido de ácido aspártico (Asp) para asparagina (Asn) (Tabela 4 e 5). Um dos clones sequenciado do indivíduo 19 apresentou uma inserção de uma adenina (A) no início da seqüência entre as posições 1513 e 1514 do gene *ryr3* de *G. gallus*, o pareamento no *Blastn* iniciou a partir da 5ª base (Anexo B) desconsiderando a inserção, porém, esta se levada em consideração, causa uma alteração no resíduo de aminoácido na posição 479 do gene *ryr3*, codificando para um ácido glutâmico (Glu) ao invés de uma glicina (Gly). Nas demais seqüências que apresentaram mutações, verificou-se uma ocorrência em cada indivíduo, sendo algumas mutações silenciosas e outras com alterações na estrutura primária (Tabelas 4 e 5; Anexo C).

Exon 2 (136 pb)

2 <i>ryr3</i>	(1)	AGGGAATGCTG	CCACTAGTTTTGAATTGCATC	AATC	ATTTT	AATGACTAC	(50)	
X95267.1	(1510)	AGGGAATGCTGG	CACTAGTTTTGAATTGCATC	GATCG	TTTAAATGACTAC		(1559)	
2 <i>ryr3</i>	(51)	AGCAGCGCAGCTC	ATTTT	ACAGAAAT	CA	CAAGAGTAGAA	GATGGTACAGC	(100)
X95267.1	(1560)	AACAGCGCAGCTC	ATTTT	GCAGAAATTT	CAAGAGTAGAAA	AATGGTACAGC	(1609)	
2 <i>ryr3</i>	(101)	GTGGAAGAG	GATTTTAAATCTC	CTTTACGAACTGCT			(136)	
X95267.1	(1610)	ATGGAAGAA	ATTTTAAATCTC	CTTTACGAACTGCT			(1645)	

Primer forward: 5' GGGAAATGCTGGCACTAGT 3'

Primer reverse: 5' GCAGTTCGTAAAGGAGATTTAA 3'

Legenda:

Vermelho: Mutação em 3 indivíduos diferentes

Azul: Mutação em clones diferentes na mesmo indivíduo

Violeta: Mutação em dois indivíduos diferentes

Verde: Mutação em somente um indivíduo.

FIGURA 10 – Seqüências de DNA das regiões exônicas estudadas do gene *ryr3* de frango comparadas com a seqüência disponível no GenBank (Nº de acesso X 95267.1)

TABELA 4 – Resumo dos resultados para hipotético *exon 2* do gene *ryr3*

Mutação	Indivíduo*	Estrutura primária
G no lugar de A Posição 1610	2; 10 e 20	Sem alteração
A no lugar de G Posição 1542	3 e 16	Asn – 489 – Asp
G no lugar de A Posição 1599	1	Asp – 508 – Asn
C no lugar de G Posição 1521	2	Pro –482 – Ala
A no lugar de T Posição 1587	3	Thr – 504 – Ser
G no lugar de A Posição 1619	9	Sem alteração
A no lugar de G Posição 1578	10	Thr – 501 – Ala
G no lugar de A Posição 1561	11	Ser – 495 – Asn
T no lugar de A Posição 1550	11	Phe – 491 – Leu
C no lugar de T Posição 1586	17	Sem alteração
A no lugar de G Posição 1546	18	His – 490 – Arg
Deleção na Posição 1552	11	Mutação sem sentido
Deleção na Posição 1552	16	Mutação sem sentido
Inserção de uma A entre as posições 1513 e 1514.	19	Glu – 479 – Gly

* OBS.: Indivíduos de 1 a 10 são classificados como normais (Controle) e indivíduos de 11 a 20 são classificados como PSE (Estressado) de acordo com os parâmetros de pH e L*.

TABELA 5 – Tradução em aminoácidos – *Blastx* para o Hipotético *exon 2* das amostras que apresentaram alteração na seqüência de nucleotídeos

INDIVÍDUO*	SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS
1_clone1	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVED D GTAWKEILNLLYEL 133
1_clone2	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVED D GTAWKEILNLLYEL 133
2_clone1	2 GML P LVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
3_clone1	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEIT R VENGTAWKEILNLLYEL 133
3_clone3	2 GMLALVLNCI N RLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
9_clone3	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
10_clone2	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
10_clone3	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF T EISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
11_clone1	2 GMLALVLNCIDRLNDY S SAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 132
11_clone3	2 GMLALVLNCID R FNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
16_clone1	2 GMLALVLNCI N RLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
16_clone2	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 132
17_clone1	2 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
18_clone1	2 GMLALVLNCID H LNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
19_clone1	3 E MALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 134
20_clone2	1 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 132
G. gallus	479 G MALVLNCID R LNDYNSAAH F A E IS R VE N GTAWKEILNLLYEL 522

* OBS.: Indivíduos de 1 a 10 são classificados como normais (Controle) e indivíduos de 11 a 20 são classificados como PSE (Estressado) de acordo com os parâmetros de pH e L*.

Legenda:

Vermelho: Mutação em 3 indivíduos diferentes

Azul: Mutação em clones diferentes no mesmo indivíduo

Violeta: Mutação em dois indivíduos diferentes

Verde: Mutação em somente um indivíduo.

No alinhamento das seqüência do hipotético *exon 4* com o gene *ryr3* em *G. gallus* (Nº de acesso X95267) verificou-se a ocorrência de 8 mutações de ponto em indivíduos distintos (Figura 11). Os indivíduos 4, 12 e 20 apresentaram mutações de ponto em diferentes clones. Na posição 1934 do gene *ryr3* observou-se uma adenina (A) no lugar de uma timina (T) no indivíduo 4 do controle sendo esta uma mutação silenciosa não ocorrendo alteração na sua estrutura primária, porém em outro clone do mesmo indivíduo uma mutação na posição 1963, uma citosina (C) no lugar de uma timina (T) levou a uma alteração no resíduo de

aminoácido na posição 629 codificando uma prolina (Pro) no lugar de uma leucina (Leu). O indivíduo 8 também pertencente ao controle apresentou uma guanina (G) no lugar de uma adenina (A) na posição 1939 alterando o resíduo de aminoácido na posição 621 (Serina (Ser) no lugar de asparagina (Asn)). Dois clones diferentes do indivíduo 12 apresentaram mutações nas posições 1950 e 1965 e apenas na posição 1950 observou-se alteração na estrutura primária (Tabela 7). Nas posições 1949 e 1941 do gene *ryr3* dos indivíduos 17 e 20, respectivamente, apresentaram mutações nas suas seqüências de nucleotídeos, mas ambos não sofreram alterações nos seus resíduos de aminoácidos. Porém, em outro clone do indivíduo 20 uma mutação na posição 1921 (timina (T) no lugar de adenina (A)) resultou em uma alteração no resíduo de aminoácido na posição 615 do gene *ryr3*, uma leucina (Leu) no lugar de glutamina (Gln) (Tabelas 6 e 7; Anexo C).

Exon 4 (130 pb)

4 <i>ryr3</i>	(1)	AGGTTCTTGACGTGCTTTGCTCTCTTTGTGTCTGTAATGGAGTTGCAGTT	(50)
X95267.1	(1861)	AGGTTCTTGACGTGCTTTGCTCTCTTTGTGTCTGTAATGGAGTTGCAGTT	(1910)
4 <i>ryr3</i>	(51)	CGTGCCAATC T AAACTTGATCTG A GACAG T TTACTGCC G GAAGAGACTT	(100)
X95267.1	(1911)	CGTGCCAATC A AAACTTGATCTG T GACA A CTACTGCC A AAGAAGAGACTT	(1960)
4 <i>ryr3</i>	(101)	AC C TC T GC A AAACACGTTTGATTAATGATGT	(130)
X95267.1	(1961)	ACTTTTGCAAACACGTTTGATTAATGATGT	(1990)

Primer Forward: 5' AGGTTCTTGACGTGCTTT 3'

Primer Reverse: 5 'CATCATTAATCAAACGTGTTT 3'

Legenda:

Vermelho: Mutação em 3 indivíduos diferentes

Azul: Mutação em clones diferentes no mesmo indivíduo

Violeta: Mutação em dois indivíduos diferentes

Verde: Mutação em somente um indivíduo.

FIGURA 11 – Seqüências de DNA das regiões exônicas estudadas do gene *ryr3* de frango comparadas com a seqüência disponível no GenBank (Nº de acesso X 95267.1)

TABELA 6 – Resumo dos resultados para o hipotético exon 4 do gene *ryr 3*

Mutação	Indivíduo*	Estrutura Primária
A no lugar de T Posição 1934	4	Sem alteração
C no lugar de T Posição 1963	4	Pro – 629 – Leu
G no lugar de A Posição 1939	8	Ser – 621 – Asn
G no lugar de A Posição 1950	12	Gly – 625 – Arg
C no lugar de T Posição 1965	12	Sem alteração
G no lugar de A Posição 1949	17	Sem alteração
T no lugar de C Posição 1941	20	Sem alteração
T no lugar de A Posição 1921	20	Leu – 615 – Gln

OBS: Indivíduos de 1 a 10 são classificados como normais (Controle) e indivíduos de 11 a 20 são classificados como PSE (Estressado) de acordo com os parâmetros de pH e L*.

TABELA 7 – Tradução em aminoácidos – *Blastx* para o Hipotético *exon 4* das amostras que apresentaram alteração na sequência de nucleotídeos

INDIVÍDUO*	SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS
4_clone1	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 128
4_clone2	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLPQTRLIND 128
8_clone1	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDSLLPRRDLLLQTRLIND 128
12_clone2	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPGRDLLLQTRLIND 128
12_clone4	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 128
17_clone1	2 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 127
20_clone1	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 128
20_clone2	3 VLDVLCSLCVCNGVAVRANLNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 128
G. gallus	596VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637

* OBS.: Indivíduos de 1 a 10 são classificados como normais (Controle) e indivíduos de 11 a 20 são classificados como PSE (Estressado) de acordo com os parâmetros de pH e L*.

Legenda:

Vermelho: Mutação em 3 indivíduos diferentes

Azul: Mutação em clones diferentes no mesmo indivíduo

Violeta: Mutação em dois indivíduos diferentes

Verde: Mutação em somente um indivíduo.

As mesmas amostras de DNA foram avaliadas por Lara (2003) nas quais foram estudados três fragmentos do gene receptor de rianodina tipo 3 (*ryr3*) (Figura 7). Lara (2003) verificou a existência de mutações de ponto em dois de seus fragmentos estudados (2 *ryr3* e 3 *ryr3*) e comprovou a variabilidade genética presente no gene *ryr3*, podendo isto levar a uma

detecção de alterações na proteína RYR3 e a possibilidade da ocorrência de PSE. No estudo realizado por Lara (2003) quatro mutações ocorreram em apenas um indivíduo e somente uma esteve presente nas vinte amostras de DNA analisadas, mas estas mutações encontradas não puderam ser relacionadas com a ocorrência de PSE na carne de frango, porque não obtiveram diferenças entre as amostras PSE e normais. Porém, observou-se que existe uma diferença na seqüência dos frangos brasileiros em relação a seqüência de *Gallus gallus* disponível no *Gene Bank*, mas a princípio não haveria relação com o problema PSE. As mutações ocorridas nos *exons* estudados (hipotéticos *exon 2* e *exon 4*) também não mostrou diferenças entre as amostras PSE e normais, não podendo ser conclusivas para o fenômeno PSE em aves.

Observou-se variabilidade entre as seqüências obtidas de um mesmo indivíduo, o que pode ser devido a diversos fatores: (1) A população de aves utilizada no experimento (F3) provavelmente apresenta heterozigose para este alelo, o que explicaria os polimorfismos encontrados dentro de indivíduos. (2) Supõe-se que algumas mutações possa ter ocorrido devido a erros introduzidos durante a amplificação dos fragmentos de PCR pela enzima Taqpolimerase ou a erros introzidos pela cepa de *E.coli* durante o processo de replicação do plasmídeo pGEM- T *Easy Vector*.

Em um estudo realizado por Strasburg e Chiang (2003) concluíram que a base genética para o problema PSE em perus ainda não está esclarecido, mas os avanços no entendimento da atividade e da variação dos receptores de rianodina podem estar relacionados a uma ou várias mutações nos repectores de rianodina do músculo esquelético em aves susceptíveis ao desenvolvimento de carne PSE. Fujii et al. (1991) relacioaram o fenômeno PSE a uma causa genética em raças de suínos sensíveis ao estresse que foi a mutação de ponto no *exon 17* do gene *ryr1*.

Strasburg e Chiang (2003) também verificaram a possibilidade da ocorrência de *splicing* alternativos nas amostras de carne de peru PSE analisadas, que influenciariam na

expressão dos transcritos e no relacionamento da qualidade da carne. O *splicing* alternativo é um mecanismo pelo qual a partir de um mesmo gene é possível a produção de proteínas com diferenças que possibilitam a realização de funções diferentes. Em muitos genes interrompidos, os *exons* codificam unidades funcionais e/ou estruturais discretas das proteínas, também chamadas de domínios. Esse tipo de organização confere a esses genes a potencialidade de gerar uma série de diferentes proteínas relacionadas, simplesmente processando um transcrito primário de diferentes maneiras (ZAHA, 2000). O *splicing* pode existir entre populações diferentes ou mesmo em indivíduos de uma mesma população, podendo prejudicar a eficiência de um teste para a detecção de PSE em um lote (LARA, 2003).

5.2 ETAPA 2

5.2.1 Caracterização da carne PSE

As amostras de carne de frango foram classificadas como carne normal e carne PSE pela mensuração dos parâmetros de cor (valor de L*) e pH 24 horas *post mortem*. Observou-se que os valores de pH e L* diferiram significativamente ($p \leq 0,001$) entre as amostras normais (Controle) e PSE (Estressado) (Tabela 8).

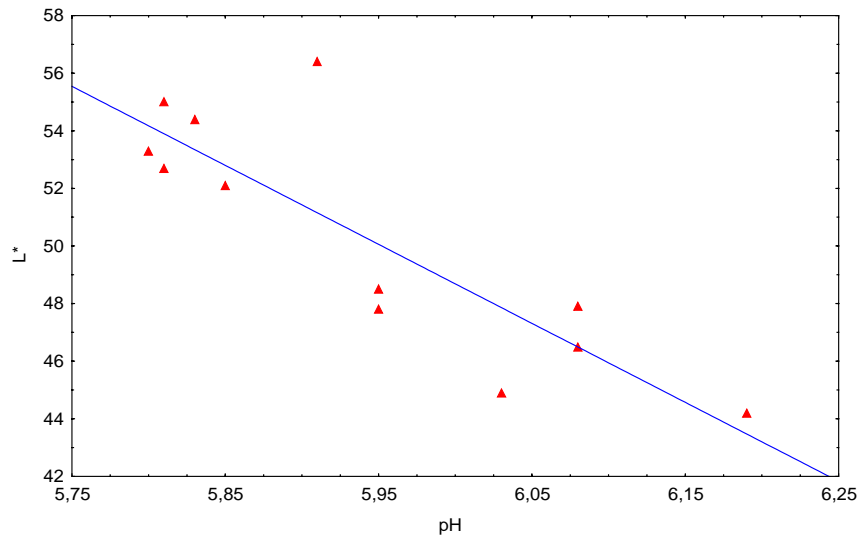
TABELA 8 – Valores de L* e pH (24 horas) nas amostras de carne de frango normal e PSE

	Controle (Normal)	Estressado (PSE)	p
pH _{24h}	6.05 ^a	5.84 ^b	0,0004
L* _{24h}	46,64 ^a	53,98 ^b	0,0000

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t* de Student a 0,1% de probabilidade ($P \leq 0,001$)

Os valores de pH_{24h} e L*_{24h} apresentaram correlações negativas significativas ($p \leq 0,001$) entre as amostras de carne de frango normais (Controle) e PSE (Estressado), verificando que o aumento do valor de L* está relacionado com a diminuição do valor de pH (Figura 12). Esta mesma correlação já foi observada por vários pesquisadores que verificaram que quanto menor o pH mais pálido se apresenta o filé, ou seja, a palidez da carne está associada com a rápida glicólise, podendo esses parâmetros (valor de L* e pH) serem utilizados para a mensuração do fenômeno PSE em carne de frango (BARBUT, 1997; SOLOMON et al., 1998; SOARES et al., 2003).

FIGURA 12 - Correlação entre os valores de $\text{pH}_{24\text{h}}$ e de $L^*_{24\text{h}}$ das amostras de carne de



frangos normais e PSE ($p \leq 0,001$, $r = -0,85445$)

5.2.2 Determinação do perfil de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos das amostras de carne normal (Controle) e PSE (Estressado) não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos teores de ácidos graxos analisados. Observou-se que o teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) nas amostras de carne de frango com características PSE apesar de não diferirem significativamente ($p \leq 0,05$) foi ligeiramente mais elevado do que nas amostras controle (PSE: $26,36 \% \pm 5,04$; Controle: $25,62 \% \pm 1,60$), destacando-se o ácido α -linolênico (PSE: $0,856 \% \pm 0,142$; Controle: $0,795 \% \pm 0,102$), o ácido 11,14-eicosadienóico (PSE: $0,343 \% \pm 0,102$, Controle: $0,299 \% \pm 0,118$), o ácido araquidônico (PSE: $2,107 \% \pm 0,874$; Controle: $1,689 \% \pm 0,201$) e o ácido adrênico (PSE: $0,782 \% \pm 0,238$; Controle: $0,669 \% \pm 0,049$) (Tabela 9 e 10; Figura 13). Nürnberg et al. (2002) também observaram diferenças na composição de ácidos graxos n-3 poliinsaturados verificando altos valores em suínos

susceptíveis a hipertemia maligna (MHS) quando comparados a composição de suínos resistentes (MHR) (MHS versus MHR: 141 ± 5 versus 116 ± 4 $\mu\text{g/g}$).

As amostras de carne PSE também apresentaram médias com valores numéricos mais elevados de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI – PSE: $44,52 \% \pm 3,00$; Controle: $42,97 \% \pm 0,19$) e ácidos graxos ômega 6 ($\omega 6$ – PSE: $25,20 \% \pm 4,75$; Controle: $24,53\% \pm 1,61$) do que nas amostras controle, porém, não houve diferença significativa a nível de 5% entre elas (Tabela 10 e Figura 13).

TABELA 9 – Composição ácidos graxos das amostras de carne de peito de frango com características Normais e PSE (%).

Ácido Graxo	Nomenclatura usual	Controle (%)	Estressado (PSE) (%)	p
C14:0	Ácido mirístico	$0,515 \pm 0,029$	$0,458 \pm 0,069$	0,1873
C14: 1n5	Ácido miristoléico	$0,079 \pm 0,005$	$0,075 \pm 0,020$	0,6949
C15:0	Ácido pentadecílico	$0,067 \pm 0,011$	$0,066 \pm 0,025$	0,9382
C16:0	Ácido palmítico	$23,646 \pm 1,506$	$21,612 \pm 1,656$	0,0748
C16: 1n9	Ácido 7-hexadecenóico	$0,412 \pm 0,058$	$0,437 \pm 0,025$	0,3998
C16: 1n7	Ácido palmitoléico	$3,684 \pm 0,265$	$3,682 \pm 0,477$	0,9993
C17:0	Ácido margárico	$0,158 \pm 0,032$	$0,146 \pm 0,022$	0,4749
C17: 1n9	Ácido 8-heptadecenóico	$0,109 \pm 0,021$	$0,108 \pm 0,001$	0,9424
C18:0	Ácido esteárico	$6,761 \pm 0,324$	$6,638 \pm 0,513$	0,6172
C18:1n9	Ácido oléico	$38,361 \pm 0,415$	$39,884 \pm 2,576$	0,2162
C18:2n6	Ácido linoléico	$21,609 \pm 1,959$	$21,691 \pm 3,564$	0,9624
C18:3n6	Ácido γ -linolênico	$0,261 \pm 0,019$	$0,273 \pm 0,030$	0,5957
C18:3n3	Ácido α -linolênico	$0,795 \pm 0,102$	$0,856 \pm 0,142$	0,4363
C20:1n9	Ácido gondóico	$0,319 \pm 0,037$	$0,327 \pm 0,004$	0,7713
C21:0	Ácido n-heneicosóico	$0,270 \pm 0,028^a$	$0,219 \pm 0,022^b$	0,0153
C20:2n6	Ác. 11,14-eicosadienóico	$0,299 \pm 0,118$	$0,343 \pm 0,102$	0,5145
C20:4n6	Ác. Araquidônico	$1,689 \pm 0,201$	$2,107 \pm 0,874$	0,3062
C20:5n3	Ácido timnodônico	$0,117 \pm 0,059$	$0,107 \pm 0,052$	0,7722
C22:4n6	Ácido adrênico	$0,669 \pm 0,049$	$0,782 \pm 0,238$	0,3092
C22:6n3	Ácido cervônico	$0,179 \pm 0,053$	$0,199 \pm 0,099$	0,6940

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

TABELA 10– Resumo do perfil de ácidos graxos das amostras de carne de frango com características normais e PSE

	Controle (%)	Estressado (PSE) (%)	p
AGPI	25,62 ± 1,60	26,36 ± 5,04	0,7447
AGMI	42,97 ± 0,19	44,52 ± 3,00	0,2637
AGS	31,42 ± 1,78	29,34 ± 2,33	0,0931
ω6	24,53 ± 1,61	25,20 ± 4,75	0,7549
ω3	1,09 ± 0,01	1,16 ± 0,30	0,5770
AGPI/AGS	0,82 ± 0,10	0,92 ± 0,23	0,3997
ω6/ω3	22,51 ± 1,70	21,90 ± 1,44	0,5420

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

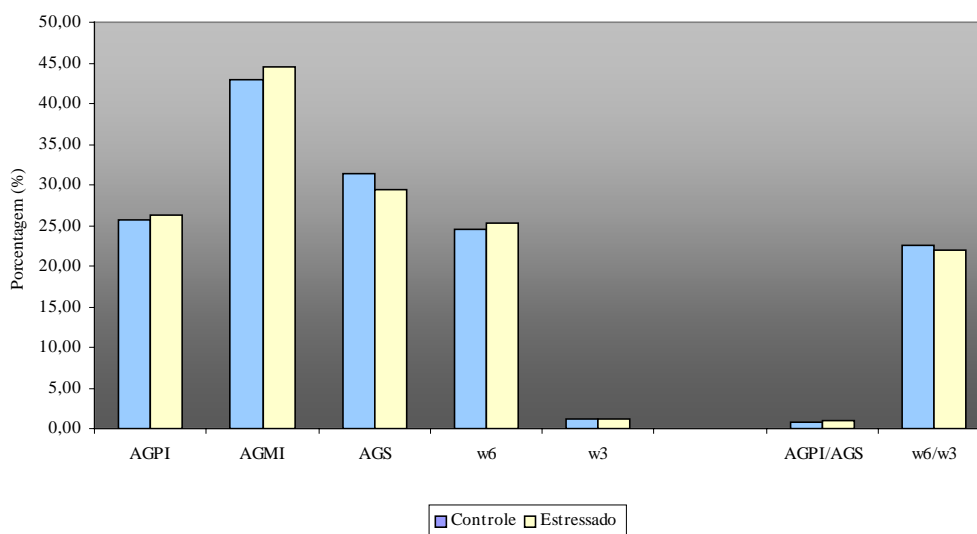


FIGURA 13 – Perfil de ácidos graxos das amostras de carne de frango

Supõe-se que o maior teor de ácido araquidônico (C20:4n6 – AA) encontrado nas amostras de carne do grupo estressado esteja associado ao fenômeno PSE (Figura 14). A liberação do ácido araquidônico (AA) pela atividade da enzima PLA₂ conduz a vários tipos de precursores e mediadores inflamatórios (MURAKAMI e KUDO., 2002; SOARES et al., 2003). Ortenbland et al. (2001) ilustraram os eventos envolvidos na formação de perdas de osmólitos e água em carne suína e verificaram que esses eventos conduzem a um aumento da

atividade da enzima e conseqüentemente a formação de ácido araquidônico (AA) e lisofosfolipídios.

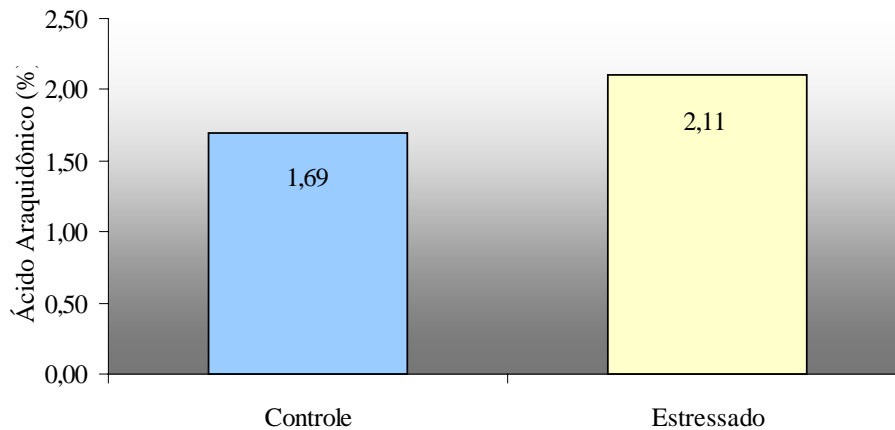


FIGURA 14 – Teor do Ácido Araquidônico (C20:4n6 – AA) nas amostras de carne normal (Controle) e PSE (Estressado).

A ocorrência do PSE em frangos está diretamente relacionada com a atividade da PLA₂. Uma diminuição do valor de pH_{24h} e um aumento no valor de L*_{24h} aumenta a atividade da enzima (SOARES, 2003). A atividade da PLA₂ estimulada pelos íons de Ca⁺², hidrolisa os fosfolipídios da membrana mitocondrial produzindo ácidos graxos de cadeia longa e lisofosfolipídios. Esses ácidos sozinhos ou em combinação com a PLA₂ podem inativar o transporte de Ca⁺² do retículo sarcoplasmático e o alto nível de Ca⁺² estimula a glicólise pela alteração da fosforilase quinase e da ATPase miofibrilar, degradando mais glicogênio do que em condições normais aumentando a produção de ácido láctico e conseqüentemente o desenvolvimento do PSE (CHEAH e CHEAH, 1981; CHEAH et al., 1995; MITCHELL, 2003). Em um estudo realizado por Cheah (1981) em suínos verificou que os ácidos araquidônico, oléico, linoléico podem influenciar na absorção e liberação de Ca⁺² pelo retículo sarcoplasmático e conseqüentemente provocar alterações bioquímicas no tecido muscular.

6 CONCLUSÕES

As mutações ocorreram em diferentes indivíduos tanto do controle quanto dos que originaram carne PSE, observando-se que a população de frango estudada apresentou heterozigose, entretanto não foi encontrada uma mutação que ocorresse somente em animais PSE ou não PSE.

Não foram observados resultados conclusivos do relacionamento do PSE em frangos com a mutação genética da proteína RYR3 nos fragmentos analisados (Hipotético *exon 2 e 4*). Portanto outros domínios do gene *ryr3* deverão ser estudados em mais detalhes.

Há um maior teor de ácido araquidônico nas amostras de carnes PSE, embora não significativo, refletindo uma maior atividade da fosfolipase A₂.

REFERÊNCIAS

ABEF – Associação Brasileira dos Exportadores de Frango. Estatísticas. Disponível em: <www.abef.com.br>. Acesso em: 20/11/2003.

ABEF – Associação Brasileira dos Exportadores de Frango. Estatísticas. Disponível em: <www.abef.com.br>. Acesso em: 18/02/2004.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search toll. **J. Mol. Biol.**, n.215, p.403-410, 1990.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, D.; SMITH, J. A.; STRUL, K. Short Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons.**, 809 p., 1995.

BARBUT, S. Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. **Br. Poult. Sci.**, Edinburgh, v. 38, n. 1, p. 74-77, 1997.

BARBUT, S. Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. **Br. Poult. Sci.**, Edinburgh, v. 38, n. 2, p. 355-358, 1997a.

BARBUT, S. Estimating the magnitude of the PSE problem in poultry. **Journal Muscle Food**, Trumbull, v. 9, n.1, p. 35-49, 1998.

BERAQUET, N. Influência de fatores ante e post-mortem na qualidade da carne de aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** v 1, p. 155-166, 1999.

BEUZEN, N. D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 42-52, 2000.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOULIANNE, M., KING, A.J. Biochemical and color characteristics of skinles boneless pale chicken breast. **Poult. Sci.**, Champaign, v.74, p.1693-1698, 1995.

CARVALHO, P. Avicultura Paulista – No rumo da modernização e da regulamentação do crescimento. **Revista Aves & Ovos.** v. 17 – 2001/2002 – especial, p. 15-31, abril de 2002.

CASTRO, A. G. M. A Interação entre Ambiente e Sanidade. **Revista Aves & Ovos.** v.16 – 2000/2001 – especial, p. 30-33, abril de 2001.

CHEAH, A.M. Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of sarcoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta, Amesterdam**, v.648, p.113-119, 1981.

CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A₂ and the interaction of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.638, p.40-49, 1981.

CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M.; WARING, J. C. Phospholipase A₂ activity, calmodulin, Ca⁺² and meat quality in young and adult halothane-sensitive and halothane-insensitive british landrace pigs. **Meat Science**, Barking, v. 7, n 1, p. 37-53, 1986.

CHEAH, K. S., CHEAH, A. M.; KRAUSGRILL, D. I. Effect of dietary supplementation of vitamin E on pig meat quality. **Meat Science** 39:255-264, 1995.

COUTINHO, L. L. Genética e melhoramento de aves. ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO: “1953-2053 o século do DNA: uma visão prospectiva”, 20, **Anais...** Piracicaba. Escola superior de agricultura Luiz Queiroz – Dpto de genética. Piracicaba/SP, p. 23-28, 2003.

DULHUNTY, A. F. et al. Interactions between Dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**. v. 79, p. 45-75, 2002.

EWING, B. et al. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

FILL, M.; COPELLO, J. A. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. **Physiological Reviews**. v. 82, pg. 893-922, 2002.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 1, p. 497-509, May. 1957.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; PROTASI, F. Ryanodine receptors or striated muscle: a complex channel capable of multiple interactions. **Physiological Review**, Baltimores, v. 77, n°3, pg. 699-729, 1997.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; LEON, S.; KHANNA, V. K., WHEELER, J. E.; O'BRIEN, P. J.; MAC LENNAN, D. H. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, 253:448-451, 1991.

GUARNIERI, P. D.; OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; LARA, J. A. F.; SHIMOKOMAKI M. Bem estar animal e qualidade da carne de aves: uma exigência dos consumidores. **Revista Nacional da Carne**, ano 26, n. 301, p. 36-44, 2002.

HARBITZ, I. B.; CHOWDARY, P. D.; THOMSEN, W.; DAVIES, U.; KAUFMANN, S. KRAN, I.; GUSTAVSSON, K.; CHRISTENSEN, J. G. HAUGE. Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11q21 segment of chromosome 6. **Genomics** v.8, p.243-248, 1990.

HOUDE, A.; POMMIER, S. A. Use of polymerase chain reaction technology to detect a mutation associated with malignant hyperthermia in different pig tissues. **Meat Science** v.33, p.349-358, 1993.

ISO – International Organization for Standardization. Animal and vegetable fats and oils – preparation of methyl esters of fatty acids. Geneve: ISO. Method ISO 5509, p. 01-06, 1978.

LAACK R.L.J.M.V. LIU, C.H. SMITH, M. O. LOVEDAY H. D. Characteristics of Pale, Soft, Exudative Broiler Breast Meat. **Poultry Science**, v. 79, p.1057-1061, 2000.

LAJOLO F. M.; NUTTI, M. R. **Transgênicos - Bases Científicas da sua Segurança**. SBAN - Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - São Paulo, 110 p., 2003

LARA, J. A. F.; LEDUR M.C.; NEPOMUCENO, A. L.; SHIMODOMAKI, M. Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Frangos. **Brazilian Journal of Poultry Science** supl. 4, Campinas, p. 15, 2002.

LARA, J. A. F. Carne PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos. Ocorrência de mutações no gene receptor da rianodina. **Tese** 2003,101f. (Doutorado em Tecnologia de alimentos e Medicamentos). 101p. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LAWRIE, R. A. **Ciencia de la Carne**. Editora Acribia, S.A. 3º edição, Zaragoza/ España, 367p. 1998.

LEDUR M. C.;LARA, J.A.; NINOV, K.; BONASSI, C. A.; SHIMOKOMAKI, M.; ZANELLA, E.; BERTANI, G. R.; NEPOMUCENO, A. L. QTL population to investigate the genetics of the pale, soft and exudative (PSE) meat in chickens. INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL GENETICS – ISAG, 28Gottingen, Germany, **Proceedings...**, 2002. p. 171-172.

LOUIS, C.F., REMPEL, W.E. and MICKELSON, J.R. Porcine stress syndrome: biochemical and genetic basis of this inherited syndrome of skeletal muscle. **Proc. Annu. Rec. Meat Conf. Am. Meat Sci.**, Assoc. 46, 89-96, 1993.

McCURDY, R. D.; BARBUT, S.; QUINTON, M. Seasonal effect on pale soft exsudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. **Food Res. Inter.**, Essex, v. 29, n. 3/4, p. 363-366, 1996.

McKEE, S.R.; SAMS, A.R. *Rigor mortis* development at elevated temperatures induces pale, exudative meat characteristics. **Poultry Science**. v.77, p.169-174,1998.

McLENNAN, D. H.; PHILLIPS, M. S. Malignant Hyperthermia. **Science Washington**, v. 256, p 789-794, 1992.

MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Malignant Hyperthermia: Excitation-Contraction Coupling, Ca²⁺ Release Channel, and Cell Ca²⁺ Regulation Defects. **Rev. American Physiological Society**, v.76, p.537-592, 1996.

MITCHELL, G.; HEFFRON, J. J. A. Porcine Stress Syndromes. **Adv. Food Res.** 28:167-229, 1982.

- MITCHELL, M. A. Muscle abnormalities: pathophysiological mechanisms (Capítulo 3). Disponível em: <<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Redingroom/0851992374/2374ch03.pdf>> Acesso em: dezembro de 2003.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 131, p. 285-292, 2002.
- NAKAMAE, I. J. PARAQUAÇU, C. Do Gene ao Galpão – novas conquistas pelo século afora. **Revista Aves & Ovos**. v.16 – 2000/2001 – especial, p. 27-29, abril de 2001.
- NAKAMAE, I. J. PARAQUAÇU, C. Nossa economia, de sucessivos imprevistos e esperança renovadas. **Revista Aves & Ovos**. v.17 – 2001/2002 – especial, p. 4-8, abril de 2002.
- NÜRNBERG, K.; KÜCHENMEISTER, U.; JAKSTADT, M.; ENDER, K.; KUHN, G.; NÜRNBERG, G.; GRUNE, T. Compositional changes in muscle of malignant hyperthermia-susceptible pigs due to postmortem alterations in lipid metabolism, lipid peroxidation and protein oxidation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15.n.3, p. 283-292 , Junho, 2002.
- OGAWA, Y.; KUREBAYASHI, N.; MURAYAMA, T. Putative Roles of Type 3 Ryanodine Receptor Isoforms (RyR3). **Trends in Cardiovascular Medicine**. v. 10, n.2, p. 65-70, Fev. 2000.
- OLIVO, R. SHIMOKOMAKI, M. FUKUSHIMA P. S. Carne PSE em frangos. **Revista Nacional da Carne** n. 252 p. 32-34, fevereiro de 1998.
- OLIVO, R. Carne PSE em Frangos. São Paulo, **Tese de Doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP/SP, 1999.
- OLIVO, R. SOARES, A. L. IDA, E. I. SHIMOKOMAKI, M. Dietary Vitaminin E Inhibits Poultry PSE and Improves Meat Functional Properties. **Journal of Food Biochemistry**, 25: 271-283, 2001.
- ORTENBLAND, N.; LAMBERT, I.H.; NIELSEN, J.H.; ANDERSEN, H.J. Phospholipase A₂ products are involved in the loss of osmolytes and cell water in meat. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 47, 2001. Cracóvia. **Proceedings...** p. 248-249, 2001.
- OTTINI L.; MARZIALI, G. ; CONTI, A.; CHARLESWORTH, A.; SORRENTINO, V. α and β Isoforms of Ryanodine Receptor from Chicken Skeletal Muscle are the Homologues of Mammalian RyR1 and RyR3. **Biochemistry Journal**, n.315, p.207-216, 1996.
- PARDI, M.C. SANTOS, I. F.SOUZA, E. R. PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne** Goiânia: Ed. UFG, 1995.
- PRICE, J. F. SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 581p.

ROCHA, A. E. M. C. En busca de soluciones para el problema de PSE. **Revista CarneTec**, p. 28-29, nov/dez., 2000.

ROUET-MAYER, M. A.; VALENTOVA, O.; SIMOND-CÔTE, E.; DAUSSANT, J.; THÉVENOT, C. Critical analysis of phospholipid hydrolyzing activities in repening tomato fruit. Study by spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography. **Lipids**, Chicago, v. 30, n 8, p. 739-746, 1995.

RÜBENSAM, J. M. **Transformações post mortem e qualidade da carne suína**. Universidade Federal do Rio Grande do sul. I Conferência Virtual sobre Qualidade da Carne Suína, 2000. Disponível em: <http://suave.cnpso.embrapa.br/pork/anais00cv_jane_pt.pdf>. Acesso: 15/09/2002.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D.; STOFFEL, D. H.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second edition. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SMITH, B. **How is contraction initiated and controlled?** Disponível em: <<http://www.zoo.utoronto.ca/berry/zoo252.htm>>. Acesso: 05/07/2003.

SOARES, A.L.; LARA, J. A. F.; IDA, E. I.; GUARNIERI, P. D.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Implementação de parâmetro de cor de filés de frango em uma linha comercial. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, p.524-527, 2002.

SOARES, A. L. PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos: implementação de parâmetros de cor e avaliação bioquímica e estrutural do filé (*Pectoralis major*). Tese (doutorado). Departamento de Tecnologia de alimentos e Medicamentos, **Centro de Ciências Agrárias**. Universidade Estadual de Londrina, 103p, 2003.

SOARES, A. L.; IDA, E.I.; MIYAMOTO, F. J. H-B.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.W.; SHIMOKOMAKI, M. Phospholipase A2 activity in poultry PSE, Pale, Soft, Exudative, meat. **Journal of Food Biochemistry**. Vol 27, n.4, 309-320p, 2003.

SOLOMON, M.B.; VAN LAACK, R. I. J. M.; EASTRIDGE, J. S. Biophysical basis of pale, soft, exudative (PSE) pork and poultry muscle: A Review. **Journal of Muscle Foods**, 9:1-11, 1998.

STATSOFT, Inc., 1995. *STATISTICA for windows* (computer program manual). Tulsa, Oklahoma, USA.

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W. Genetic Basis for Pale, Soft and Exudative Turkey meat. Proceedings of the 56th American Meat Science Association Reciprocal Meat Conference. 15-18 de junho. Colúmbia, Missouri. 2003. Disponível em: <www.meatscience.org>. Acesso em: janeiro de 2004.

SUTKO, J.L.; AIREY, J.A. Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release Channels: Does Diversity in Form Equal Diversity in Function? **Physiological Reviews**. v. 76, n.4, p. 1027-1071, out., 1996.

UBA – União Brasileira de Avicultura. Disponível em: <www.uba.org.br>. Acesso em: fevereiro/2004.

VARNAM A. H. SUTHERLAND, J. P. **Carne y Productos Cárnicos – Tecnología, Química y Microbiología**. Zaragoza: Acríbia, 1998. 423 p.

WHEELER, B. R.. et al. Halothate test to detect turkeys prone to developing pale, soft, and exudative meat. **Poultry Science**, v.78, p.1634-1638, 1999.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. 2. ed. Porto Alegre: [Sn.] 2000. 336p.

ANEXOS

ANEXO A

Alinhamento das seqüências obtidas do gene *ryr3* para os Hipotéticos *exons 2* e 4. Foram sequenciados de 1 a 4 clones do mesmo indivíduo. Os indivíduos de 1 a 10 são classificados como normais que não originaram carne PSE (Controle) e de 11 a 20 são classificados como PSE.

Exon 2**Indivíduos Normais (1 ao 10)**

	1	60
Indivíduo 1_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 1_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 1_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 2_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 2_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 3_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 3_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 3_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCAATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 4_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 4_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 4_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 5_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 5_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 5_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 6_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 6_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 7_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 8_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 9_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 9_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 9_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 10_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 10_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 10_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
exon2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	

Indivíduos PSE (11 ao 20)

	1	60
Indivíduo 11_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAA--TGACTACAGCAGCGCAG	
Indivíduo 11_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 11_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 12_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 12_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 13_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 14_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 14_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 15_clone2	(1) --GGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 16_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAA--TGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 16_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCAATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 17_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 17_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 17_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 18_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCA--TTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 18_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 18_clone3	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 19_clone1	(1) GGGAAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 19_clone2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 20_clone1	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
Indivíduo 20_clone2	(1) --GGGA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	
exon2	(1) GGGAA--TGCTGGCACTAGTTTTGAATTGCATCGATCGTTTAAATGACTACAACAGCGCAG	

Indivíduos Normais (1 ao 10)

	121	135
Indivíduo 1_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 1_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 1_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 2_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 2_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 3_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 3_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 3_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 4_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 4_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 4_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 5_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 5_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 5_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 6_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 6_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 7_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 8_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 9_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 9_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 9_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 10_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 10_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 10_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
exon2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	

Indivíduos PSE (11 ao 20)

	121	135
Indivíduo 11_clone1 (119)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 11_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 11_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 12_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 12_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 13_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 14_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 14_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 15_clone2 (119)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 16_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 16_clone2 (119)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 17_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 17_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 17_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 18_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 18_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 18_clone3 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 19_clone1 (121)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 19_clone2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 20_clone1 (120)	TCCTTTACGAACTGC	
Indivíduo 20_clone2 (119)	TCCTTTACGAACTGC	
exon2 (120)	TCCTTTACGAACTGC	

Indivíduos Normais (1 ao 10)

121

Indivíduo 1_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 1_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 2_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 2_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 3_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 3_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 4_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 4_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 4_clone3	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 5_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 5_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 6_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 6_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 7_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 7_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 8_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 8_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 8_clone3	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 9_clone	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 10_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 10_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 10_clone3	(121)	TTAATGATG
exon4	(121)	TTAATGATG

Indivíduos PSE (11 ao 20)

121

Indivíduo 11_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 11_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 12_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 12_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 12_clone3	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 12_clone4	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 13_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 13_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 14_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 14_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 15_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 15_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 16_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 16_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 17_clone1	(120)	TTAATGATG
Indivíduo 17_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 17_clone3	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 17_clone4	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 18_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 18_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 19_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 19_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 20_clone1	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 20_clone2	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 20_clone3	(121)	TTAATGATG
Indivíduo 20_clone4	(121)	TTAATGATG
exon4	(121)	TTAATGATG

ANEXO B

Resultado do *Blastn* (NCBI – <www.ncbi.nlm.nih.gov>) dos fragmentos 2 (Hipotético *exon 2*) e 4 (Hipotético *exon 4*).

Hipotético *Exon 2*

Indivíduo 1_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
```

```
Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
Identities = 133/134 (99%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaataactacaacagcgagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaataactacaacagcgagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaagatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaagatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 1_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
```

```
Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
Identities = 133/134 (99%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaataactacaacagcgagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaataactacaacagcgagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaagatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaagatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 1_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 2_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      .Score = 250 bits (126), Expect = 5e-64
      Identities = 132/134 (98%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctgccactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcgtggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 2_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 3_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaattacaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 3_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 3_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcaatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaactct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 4_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 4_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 4_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 264 bits (133), Expect = 3e-68
      Identities = 133/133 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactg 133
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactg 1643
```

Indivíduo 5_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 5_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 5_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 6_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 6_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 7_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 8_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 252 bits (127), Expect = 1e-64
      Identities = 130/131 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 2   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 61
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 62   tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 121
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 122  cctttcacgaac 132
          |||
Sbjct: 1631 cctttcacgaac 1641
```

Indivíduo 9_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 9_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 9_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagagattttaaatct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 10_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 10_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
          |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61   tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcgtggaaagaaattttaaatct 120
          |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121  cctttacgaactgc 134
          |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 10_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 1570

Query: 61      tcattttacagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 11_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 242 bits (122), Expect = 1e-61
      Identities = 132/134 (98%), Gaps = 1/134 (0%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaa-tgactacagcagcgcgagc 59
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 1570

Query: 60      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 119
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 120     cctttacgaactgc 133
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 11_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 264 bits (133), Expect = 3e-68
      Identities = 133/133 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactg 133
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactg 1643
```

Indivíduo 11_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 12_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 264 bits (133), Expect = 3e-68
      Identities = 133/133 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactg 133
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactg 1643
```

Indivíduo 12_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 264 bits (133), Expect = 3e-68
      Identities = 133/133 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactg 133
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactg 1643
```

Indivíduo 13_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 14_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 14_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcgagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 15_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 264 bits (133), Expect = 3e-68
      Identities = 133/133 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      ggaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgagct 60
      |||
Sbjct: 1512 ggaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgagct 1571

Query: 61      cattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatctc 120
      |||
Sbjct: 1572 cattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatctc 1631

Query: 121     ctttacgaactgc 133
      |||
Sbjct: 1632 ctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 16_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcaatcgtttaaatgactacaacagcgagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 16_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 250 bits (126), Expect = 5e-64
      Identities = 133/134 (99%), Gaps = 1/134 (0%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaa-tgactacaacagcgagc 59
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgagc 1570

Query: 60      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 119
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 120     cctttacgaactgc 133
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 17_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatctcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatctcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 17_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatctcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatctcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 17_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511  gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatctcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571  tcattttgcagaaatctcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631  cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 18_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 258 bits (130), Expect = 2e-66
      Identities = 133/134 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcatttaaagactacaacagcgcgc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaagactacaacagcgcgc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 18_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaagactacaacagcgcgc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaagactacaacagcgcgc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 18_exon2_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaagactacaacagcgcgc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaagactacaacagcgcgc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaaatggtacagcatggaaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 19_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 260 bits (131), Expect = 5e-67
      Identities = 131/131 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 5      aatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagctca 64
      |||
Sbjct: 1514 aatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagctca 1573

Query: 65      ttttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaagaaattttaaatctcct 124
      |||
Sbjct: 1574 ttttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaagaaattttaaatctcct 1633

Query: 125     ttacgaactgc 135
      |||
Sbjct: 1634 ttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 19_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 20_exon2_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 266 bits (134), Expect = 9e-69
      Identities = 134/134 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1      gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 60
      |||
Sbjct: 1511 gggaaatgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagc 1570

Query: 61      tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaagaaattttaaatct 120
      |||
Sbjct: 1571 tcattttgcagaaatttcaagagtagaaaatggtacagcatggaagaaattttaaatct 1630

Query: 121     cctttacgaactgc 134
      |||
Sbjct: 1631 cctttacgaactgc 1644
```

Indivíduo 20_exon2_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 250 bits (126), Expect = 5e-64
      Identities = 129/130 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 4 atgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagctcat 63
      |||
Sbjct: 1515 atgctggcactagttttgaattgcatcgatcgtttaaatgactacaacagcgcagctcat 1574
```

```
Query: 64 tttgcagaaatccaagagtagaaaatggtacagcgtggaagaaatccaatctcctt 123
      |||
Sbjct: 1575 tttgcagaaatccaagagtagaaaatggtacagcgtggaagaaatccaatctcctt 1634
```

```
Query: 124 tacgaactgc 133
      |||
Sbjct: 1635 tacgaactgc 1644
```

Hipotético Exon 4**Indivíduo 1_exon4_clone1**

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
      |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920
```

```
Query: 61 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
      |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980
```

```
Query: 121 ttaatgatg 129
      |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 1_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
      |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920
```

```
Query: 61 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
      |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980
```

```
Query: 121 ttaatgatg 129
      |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 2_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 2_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 3_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 3_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 4_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgagacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 4_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacctttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 4_exon4_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 5_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 5_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 6_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 6_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 7_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 7_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 8_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacagtctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 8_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 8_exon4_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 9_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 10_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 10_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 10_exon4_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 11_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 11_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 12_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 12_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaggaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaggaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 12_exon4_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 12_exon4_clone4

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttctgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttctgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 13_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 13_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 14_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 14_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 15_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 15_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 16_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 16_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121   ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 17_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 246 bits (124), Expect = 8e-63
      Identities = 127/128 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   ggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatca 60
          |||
Sbjct: 1862 ggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatca 1921

Query: 61   aaacttgatctgtgacaatctactgccgagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1922 aaacttgatctgtgacaatctactgccgagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1981

Query: 121   taatgatg 128
          |||
Sbjct: 1982 taatgatg 1989
```

Indivíduo 17_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121   ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 17_exon4_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 17_exon4_clone4

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 18_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttccttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 18_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 19_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 19_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 20_exon4_clone1

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatttactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 20_exon4_clone2

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
      Identities = 128/129 (99%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   taaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 20_exon4_clone3

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3   G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
      Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
      Identities = 129/129 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1   aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
          |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920

Query: 61   aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
          |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980

Query: 121  ttaatgatg 129
          |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Indivíduo 20_exon4_clone4

```
>gi|1212911|emb|X95267.1|GGRYR3 G.gallus mRNA for ryanodine receptor type 3
      Length = 15089
Score = 256 bits (129), Expect = 8e-66
Identities = 129/129 (100%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 1 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 60
      |||
Sbjct: 1861 aggttcttgacgtgctttgctctctttgtgtctgtaatggagttgcagttcgtgccaatc 1920
```

```
Query: 61 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 120
      |||
Sbjct: 1921 aaaacttgatctgtgacaatctactgccaagaagagacttacttttgcaaacacgtttga 1980
```

```
Query: 121 ttaatgatg 129
      |||
Sbjct: 1981 ttaatgatg 1989
```

Anexo C

Resultado do *Blastx* dos fragmentos 2 (Hipotético *exon 2*) e 4 (Hipotético *exon 4*) das seqüências que apresentaram alterações na estrutura primária.

Hipotético *Exon 2*

Indivíduo 1_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.1 bits (222), Expect = 1e-17
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVEDGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVE+GTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 1_exon2_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.1 bits (222), Expect = 1e-17
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVEDGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVE+GTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 2_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.1 bits (222), Expect = 1e-17
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 43/44 (97%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLPLVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GML LVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 3_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.9 bits (224), Expect = 6e-18
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEITRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEI+RVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 3_exon2_clone3

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.1 bits (222), Expect = 1e-17
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCINRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCI+RLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 9_exon2_clone3

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 92.0 bits (227), Expect = 3e-18
      Identities = 44/44 (100%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 10_exon2_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 92.0 bits (227), Expect = 3e-18
      Identities = 44/44 (100%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 10_exon2_clone3

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.5 bits (223), Expect = 8e-18
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 43/44 (97%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFTEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF EISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 11_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 65.1 bits (157), Expect(2) = 5e-13
      Identities = 30/31 (96%), Positives = 31/31 (100%)
      Frame = +1
Query: 40  NDYSSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 132
           NDY+SAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 492 NDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
      Score = 29.6 bits (65), Expect(2) = 5e-13
      Identities = 13/13 (100%), Positives = 13/13 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRL 40
           GMLALVLNCIDRL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRL 491
```

Indivíduo 11_exon2_clone3

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.5 bits (223), Expect = 8e-18
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 43/44 (97%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCIDRFNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCIDR NDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 16_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869 Score = 90.1 bits (222), Expect = 1e-17
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   GMLALVLNCINRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
           GMLALVLNCI+RLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHFAEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 16_exon2_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 67.0 bits (162), Expect(2) = 1e-13
      Identities = 31/31 (100%), Positives = 31/31 (100%)
      Frame = +1
Query: 40 NDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 132
          NDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 492 NDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522

      Score = 29.6 bits (65), Expect(2) = 1e-13
      Identities = 13/13 (100%), Positives = 13/13 (100%)
      Frame = +2
Query: 2  GMLALVLNCIDRL 40
          GMLALVLNCIDRL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRL 491
```

Indivíduo 17_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 92.0 bits (227), Expect = 3e-18
      Identities = 44/44 (100%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +2
Query: 2  GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
          GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 18_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 90.1 bits (222), Expect = 1e-17
      Identities = 43/44 (97%), Positives = 43/44 (97%)
      Frame = +2
Query: 2  GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 133
          GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 19_exon2_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 89.7 bits (221), Expect = 1e-17
      Identities = 43/43 (100%), Positives = 43/43 (100%)
      Frame = +3
Query: 6  MLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 134
          MLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 480 MLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Indivíduo 20_exon2_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 92.0 bits (227), Expect = 3e-18
      Identities = 44/44 (100%), Positives = 44/44 (100%)
      Frame = +1
Query: 1  GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 132
          GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL
Sbjct: 479 GMLALVLNCIDRLNDYNSAAHF AEISRVENGTAWKEILNLLYEL 522
```

Hipotético Exon 4

Indivíduo 4_exon4_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 52.0 bits (123), Expect = 3e-06
      Identities = 27/42 (64%), Positives = 27/42 (64%)
      Frame = +3
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQXXXXXXXXXXXXXXXXXQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQ                        QTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 4_exon4_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 85.9 bits (211), Expect = 2e-16
      Identities = 41/42 (97%), Positives = 41/42 (97%)
      Frame = +3
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDPLQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRD LQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 8_exon4_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 86.7 bits (213), Expect = 1e-16
      Identities = 41/42 (97%), Positives = 42/42 (100%)
      Frame = +3
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDSSLPRRDLLLQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICD+LLPRRDLLLQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 12_exon4_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 85.9 bits (211), Expect = 2e-16
      Identities = 41/42 (97%), Positives = 41/42 (97%)
      Frame = +3
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPGRDLLLQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLP RDLLLQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 12_exon4_clone4

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 88.6 bits (218), Expect = 3e-17
      Identities = 42/42 (100%), Positives = 42/42 (100%)
      Frame = +3
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 17_exon4_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869 Score = 88.6 bits (218), Expect = 3e-17
      Identities = 42/42 (100%), Positives = 42/42 (100%)
      Frame = +2
Query: 2   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 127
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLICDNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 20_exon4_clone1

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 88.6 bits (218), Expect = 3e-17
      Identities = 42/42 (100%), Positives = 42/42 (100%)
      Frame = +3
```

```
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLCNLLPRRDLLLQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLCNLLPRRDLLLQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLCNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```

Indivíduo 20_exon4_clone2

```
>gi|1212912|emb|CAA64563.1| ryanodine receptor type 3 [Gallus gallus]
      Length = 4869
      Score = 85.9 bits (211), Expect = 2e-16
      Identities = 41/42 (97%), Positives = 41/42 (97%)
      Frame = +3
```

```
Query: 3   VLDVLCSLCVCNGVAVRANLNLCNLLPRRDLLLQTRLIND 128
          VLDVLCSLCVCNGVAVRAN  NLICNLLPRRDLLLQTRLIND
Sbjct: 596 VLDVLCSLCVCNGVAVRANQNLCNLLPRRDLLLQTRLIND 637
```